

# UNIVERSITÀ DI PISA



## DIPARTIMENTO DI FARMACIA

Corso di Laurea Magistrale in Farmacia

### **Rilascio controllato di Idrogeno Solforato negli organi bersaglio: sviluppo di profarmaci innovativi**

**Relatore:**

**Prof.ssa Simona Rapposelli**

**Candidata:**

**Rosellina Giacalone**

**Anno Accademico 2015-2016**



# INDICE

## CAPITOLO 1

<b>Introduzione</b>	pag. 5
1.1 Sintesi di H <sub>2</sub> S	pag. 6
1.2 Metabolismo ed escrezione di H <sub>2</sub> S	pag. 7
1.3 Distribuzione tessuto-specifica e classificazione degli enzimi produttori H <sub>2</sub> S	pag. 8
1.4 Livelli tissutali ed ematici di H <sub>2</sub> S	pag. 9
1.5 Effetti cellulari e molecolari di H <sub>2</sub> S	pag. 10
1.5.1 Interazioni con canali ionici	pag. 10
1.5.2 Interazioni con i classici secondi messaggeri	pag. 13
1.5.3 S-sulfidrazione delle proteine	pag. 14
1.5.4 Ruolo nel bilanciamento delle ossido-riduzioni	pag. 16
1.5.5 La captazione dell'ossigeno e la bioenergetica Mitocondriale	pag. 18

## CAPITOLO 2

<b>H<sub>2</sub>S nei processi patologici</b>	pag. 19
2.1 Ipertensione e rimodellamento vascolare	pag. 19
2.2 Angiogenesi	pag. 20
2.3 Aterosclerosi	pag. 21

2.4 Anomalie del metabolismo lipidico e patologie epatiche	pag. 22
2.5 Diabete	pag. 23
2.6 Patologie neurodegenerative	pag. 24
2.7 Disturbi gastrointestinali	pag. 26
2.8 Patologie genetiche umane legate agli enzimi per la sintesi di H <sub>2</sub> S	pag. 30

## **CAPITOLO 3**

<b>Donatori di H<sub>2</sub>S</b>	pag. 31
3.1 S-Nitrosotioili	pag. 31
3.2 Ariltioammidi	pag. 37
3.3 Isotiocianati naturali	pag. 40
3.3.1 Sulforafano	pag. 44
3.4.1 Sulforafano contro lo stress ossidativo	pag. 45
3.4.2 Sulforafano contro la neurodegenerazione acuta	pag. 46
3.4.3 Il sulforafano e il danno cerebrale da trauma	pag. 46

## **CAPITOLO 4**

<b>Applicazioni terapeutiche</b>	pag. 47
4.1 Gli effetti protettivi del sulforafano contro la neurodegenerazione cronica	pag. 47
4.1.1 Morbo di Alzheimer	pag. 47

4.1.2 Morbo di Parkinson	pag. 47
4.2 H <sub>2</sub> S e FANS nel trattamento di patologie infiammatorie	pag. 48
4.3 H <sub>2</sub> S e EXP-3174 nel trattamento dell'ipertensione	pag. 52
4.4 H <sub>2</sub> S e Alendronato nel trattamento dell'osteoporosi	pag. 53
 <b>Conclusioni</b>	 pag. 55
<b>Bibliografia</b>	pag. 57

# CAPITOLO 1

## Introduzione

Il ruolo fisiopatologico e farmacologico di " gasotrasmettitori " rappresenta ad oggi una tematica di ricerca innovativa che ha permesso di evidenziare l'importanza biologica di alcune piccole molecole gassose, quali NO e CO, con conseguenti implicazioni nella scoperta di nuovi farmaci.

Il mediatore ossido nitrico (NO) svolge infatti molteplici funzioni nella modulazione fisiologica del sistema cardiovascolare e tale scoperta ha profondamente influenzato lo sviluppo della farmacologia cardiovascolare nell'ultima decade.

Recentemente, il solfuro di idrogeno ( $H_2S$ ) è emerso come ulteriore candidato nel campo della scoperta di nuovi farmaci.  $H_2S$  è un noto gas pungente e tossico. Numerose evidenze sperimentali indicano che l'idrogeno solforato è una molecola gassosa endogena prodotta in quantità sostanziali dai tessuti dei mammiferi, che esercita una varietà di effetti fisiologici in diversi sistemi ed in particolare nel sistema cardiovascolare, nei processi

infiammatori, nella secrezione

I mediatori gassosi ( $NO$ ,  $CO$  e  $H_2S$ ) proprietà comuni: molecole capaci di rapidamente



neurotrasmissione, insulinica.

attualmente noti condividono alcune sono piccole diffondere attraverso le

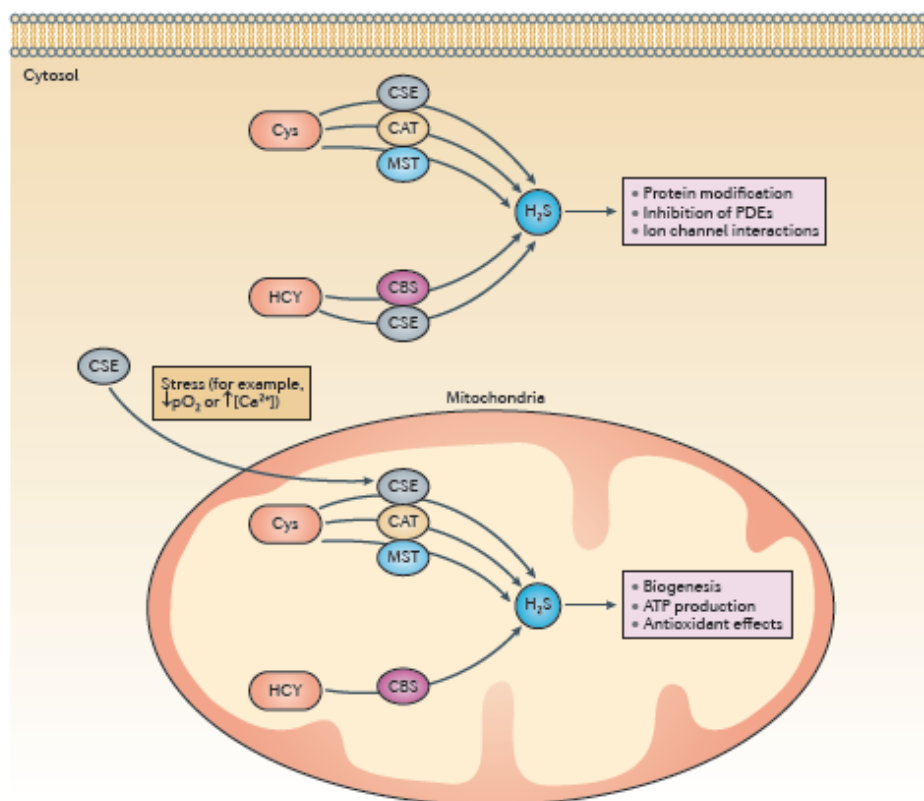
membrane biologiche; sono prodotte fisiologicamente e svolgono un'azione di controllo su alcune funzioni biologiche importanti per l'omeostasi cellulare attraverso l'interazione con specifici bersagli farmacologici; hanno una breve emivita plasmatica e risultano essere tossiche a concentrazioni elevate.

Negli ultimi anni i metodi di misura dei livelli di  $H_2S$ , una maggiore disponibilità di donatori di  $H_2S$  e inibitori più selettivi di  $H_2S$ , hanno aiutato ad identificare in maniera più accurata i numerosi effetti di questo mediatore gassoso altamente reattivo. Studi in vivo, condotti con farmaci donatori di  $H_2S$  hanno dimostrato che potranno essere formulati trattamenti sicuri per una vasta gamma di malattie. In questa tesi saranno

trattati i seguenti argomenti: (a) la biosintesi e i processi, metabolici di  $H_2S$ , (b) i suoi principali meccanismi d'azione e (c) alcuni processi patologici in cui  $H_2S$  sembra svolgere un ruolo chiave. Verranno inoltre discussi (d) i principali farmaci di sintesi e alcuni derivati naturali capaci di rilasciare  $H_2S$  in vivo e (e) le possibili applicazioni farmaceutiche nel trattamento di patologie osteoarticolari, infiammatorie e cardiovascolari.

## **1.1 Sintesi del $H_2S$**

L' $H_2S$  è sintetizzato nei tessuti dei mammiferi tramite due enzimi piridossal-5-fosfato-dipendenti (PLP): la cistationina $\gamma$ -liasi (CSE) e la cistationina $\beta$ -sintasi (CBS), che utilizzano come substrato la L-cisteina e la omocisteina. A differenza del CSE, il CBS contiene un dominio eme costituito da 70 amminoacidi che rappresenta un sito di interazione per altri due gastransmettitori: NO e CO. Questo enzima riveste un ruolo importante perché agisce anche come sensore riducente per regolare la propria produzione di  $H_2S$ . Altri enzimi implicati nella sintesi di  $H_2S$ , sono la cisteina aminotransferasi (CAT), il 3-mercaptopiruvato solfotransferasi (MST) e la rodanasi (conosciuta anche come tiosolfato-solfotransferasi) [1]. Tuttavia, l'importanza biologica e fisiologica di questo enzima nel metabolismo endogeno del  $H_2S$ , non è stata ancora del tutto chiarita. A differenza del MST, che è localizzato sia nel citosol che nei mitocondri, la rodanasi è una vera proteina mitocondriale (Figura 1).



**Figura 1. Produzione citosolica e mitocondriale di H<sub>2</sub>S, e le sue funzioni.**

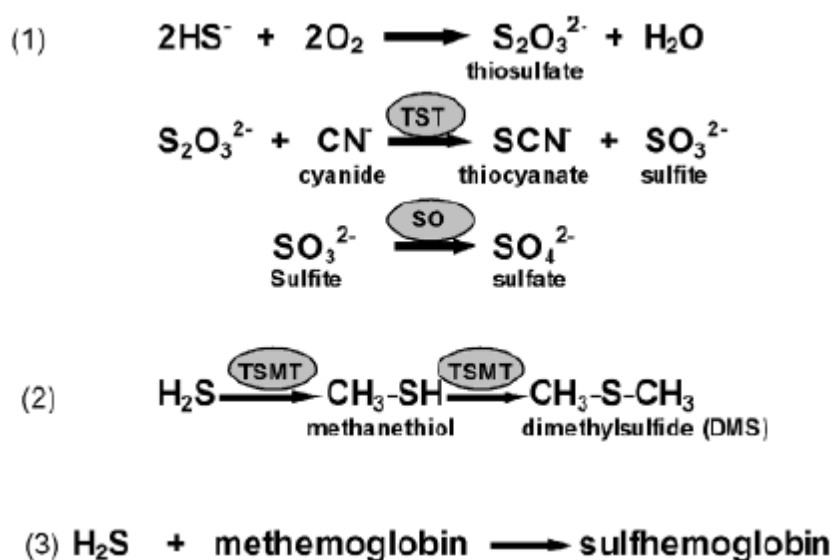
La produzione endogena di solfuro di idrogeno può verificarsi nel citoplasma e/o nei mitocondri. La Cistationina  $\gamma$ -liasi (CSE) media la produzione di H<sub>2</sub>S nel citoplasma, tuttavia, in condizioni di stress CSE può traslocare dal citoplasma al mitocondrio, dove produce H<sub>2</sub>S. La cisteina aminotransferasi (CAT) e il 3-mercaptopiruvato sulfotransferasi (MST) sono situati sia nel citosol che nei mitocondri, e regolano la produzione di H<sub>2</sub>S. La cistationina  $\beta$ -sintasi (CBS) invece si trova prevalentemente nel citoplasma, ma può anche trovarsi nei mitocondri di alcune cellule e in condizioni di riposo. L'ipossia riduce la degradazione di CBS nel mitocondrio, che porta ad un accumulo di CBS con conseguente rilascio di H<sub>2</sub>S. HCY, omocisteina; PDE, fosfodiesterasi; pO<sub>2</sub>, pressione parziale di ossigeno.

## 1.2 Metabolismo ed escrezione di H<sub>2</sub>S

Diversamente da NO, H<sub>2</sub>S è relativamente stabile nei liquidi corporei. Benchè siano ben note le proprietà riducenti dell'H<sub>2</sub>S e la sua elevata reattività con numerose specie ossidanti, la via catabolica più importante che porta alla degradazione di questo gas trasmettitore si realizza a livello mitocondriale. L'ossidazione di H<sub>2</sub>S avviene ad opera di una serie di enzimi specifici. Il solfuro ossidato a tiosolfato mediante una reazione (non enzimatica) legata al trasporto di elettroni nella respirazione mitocondriale, viene convertito in solfito ad opera della rodanasi (TST) ed in presenza di ioni cianuro. Successivamente il solfito viene convertito in solfato ad opera dell'enzima solfito



ossidasi (SO) (Figura 2). E' stato identificato un ulteriore meccanismo di degradazione dell'H<sub>2</sub>S che avviene unicamente a livello del citosol e che è caratterizzato dalla metilazione del solfuro di idrogeno a metantiolo e successivamente a solfuro di metile. Tali trasformazioni risultano catalizzate dall'enzima S-metiltransferasi (TSMT) (Figura 2). Infine, un'altra importante via metabolica dell'idrogeno solforato coinvolge il legame con la metaemoglobina che porta alla formazione di zolfo-metaemoglobina. I principali prodotti del catabolismo di H<sub>2</sub>S sono poi eliminati con l'urina tramite le vie aeree [2].



**Figura 2. Catabolismo di H<sub>2</sub>S.** (1): ossidazione mitocondriale. (2): metilazione citosolica. (3): legame all'emoglobina. SO: solfito ossidasi TSMT: tiolo S-metiltransferasi. TST: tiosolfato-cianuro-zolfo-transferasi(rodanasi).

### **1.3 Distribuzione tessuto-specifica e classificazione degli enzimi produttori H<sub>2</sub>S**

Gli enzimi CSE e CBS sono i principali responsabili della biosintesi di H<sub>2</sub>S. L'enzima CSE è espresso prevalentemente a livello del sistema cardiovascolare, e in alcuni organi quali fegato, rene, utero, placenta, pancreas, polmone e tratto gastrointestinale. Un recente studio ha inoltre rivelato l'espressione di tale enzima anche a livello del SNC ed in particolare nello striato, nella corteccia cerebrale e nel cervelletto.

Per quanto riguarda l'enzima CBS risulta invece espresso prevalentemente a livello del SNC. Tale enzima è stato identificato nell'ippocampo, nel cervelletto, nella corteccia

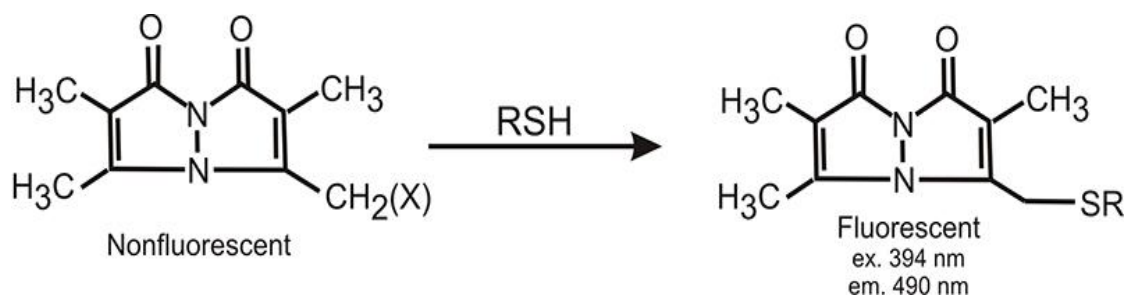
cerebrale e nel sistema nervoso [3]. Anche MST, altro enzima responsabile della biosintesi, è espresso nel sistema nervoso centrale, per lo più in cellule gliali, neuroni piramidali dell'ippocampo, cellule cerebellari di Purkinje e cellule mitrali del bulbo olfattivo. L'espressione di MST è stata anche rilevata nelle cellule vascolari della muscolatura liscia, nei cardiomiociti, nelle cellule renali e del fegato.

In condizioni fisiologiche, CSE risulta essere localizzato principalmente nel citosol. L'aumento dei livelli di calcio intracellulare nelle cellule della muscolatura liscia vascolare, dovuto sia all'ingresso di calcio extracellulare o al rilascio di calcio intracellulare dal reticolo endoplasmatico, innesca la migrazione del CSE dal citosol ai mitocondri. Tuttavia le sostanze endogene o le sostanze che provocano la traslocazione di CSE al mitocondrio non sono ancora state identificate. Sulla base dell'espressione dei principali enzimi responsabili della biosintesi di  $H_2S$  localizzati in specifici tessuti, è evidente che la produzione di  $H_2S$  nel sistema cardiovascolare è prevalentemente regolata da CSE, mentre a livello del SNC l'enzima responsabile della produzione di  $H_2S$  è il CBS.

#### **1.4 Livelli tissutali ed ematici di $H_2S$**

La produzione tissutale e i livelli ematici di  $H_2S$  sono stati oggetto di molte controversie. Il principale metodo impiegato per valutare i livelli sierici, plasmatici o tissutali e la sintesi di  $H_2S$  in esseri umani e modelli animali di malattie umane, utilizza un approccio spettrofotometrico basato sul blu di metilene. In questa procedura  $H_2S$  / $HS^-$  e/o solfuro acquoso viene "fissato" o "intrappolato" nei campioni biologici con lo zinco per prevenire la perdita di  $H_2S$  attraverso volatilizzazione e ossidazione aerea, causando la formazione di  $ZnS$  (solfuro di zinco) stabile. In condizioni fortemente acide,  $H_2S$  viene rilasciato dal  $ZnS$  e, in presenza di DMPD (N,N-dimetil-p-fenilendiammina) e  $Fe^{3+}$ , si ha la formazione del colorante blu di metilene, una tiazina eterociclica, che viene poi misurata attraverso spettrofotometria o HPLC. In queste condizioni, i livelli sierici e plasmatici in individui sani sono risultati essere nel range tra 20 e 60  $\mu M$ , sebbene utilizzando questo metodo siano stati riportati livelli considerevolmente più elevati, ad esempio >100  $\mu M$  e in eccesso di 300  $\mu M$  nel plasma di roditori [4]. Altre tecniche utilizzate per rilevare i valori di  $H_2S$  (o specie derivate) nel plasma e nel siero, sono: l'impiego di elettrodi solfuro-selettivi, la microdistillazione, la cromatografia ionica. Questi metodi hanno una sensibilità piuttosto bassa e sono capaci di determinare

concentrazioni di  $\text{H}_2\text{S}$  che oscillano tra 20 e 60  $\mu\text{M}$  [5]. Più recentemente, sono stati sviluppati metodi basati sulla fluorimetria, impiegando *monobromobimano* per intrappolare  $\text{H}_2\text{S}$  libero e il *dibimano* risultante determinato mediante HPLC a fase inversa, per dimostrare che i livelli basali di  $\text{H}_2\text{S}$  libero sono compresi tra 0,4 e 0,9  $\mu\text{M}$ .



È quindi probabile che altri metodi, che misurano la somma totale di specie  $\text{H}_2\text{S}$  derivate, come  $\text{HS}^-$  e  $\text{S}_2^{2-}$ , e possibilmente altre molecole carrier fisiologiche di  $\text{H}_2\text{S}$ , che esistono a pH fisiologico e che rilasciano  $\text{H}_2\text{S}$  in condizioni acide, siano impiegati in processi analitici, piuttosto che lo stesso  $\text{H}_2\text{S}$  libero, e occorre prestare attenzione a descrivere i risultati come tali [6]. Ad oggi, non è chiaro che ruolo abbiano la dieta (es. assunzione di cisteina), l'esercizio fisico e i trattamenti farmacologici (presenti e passati) nella determinazione dei livelli ematici e tissutali di  $\text{H}_2\text{S}$  (e le sue specie derivate in condizioni fisiologiche) e di metaboliti derivanti dal suo catabolismo.

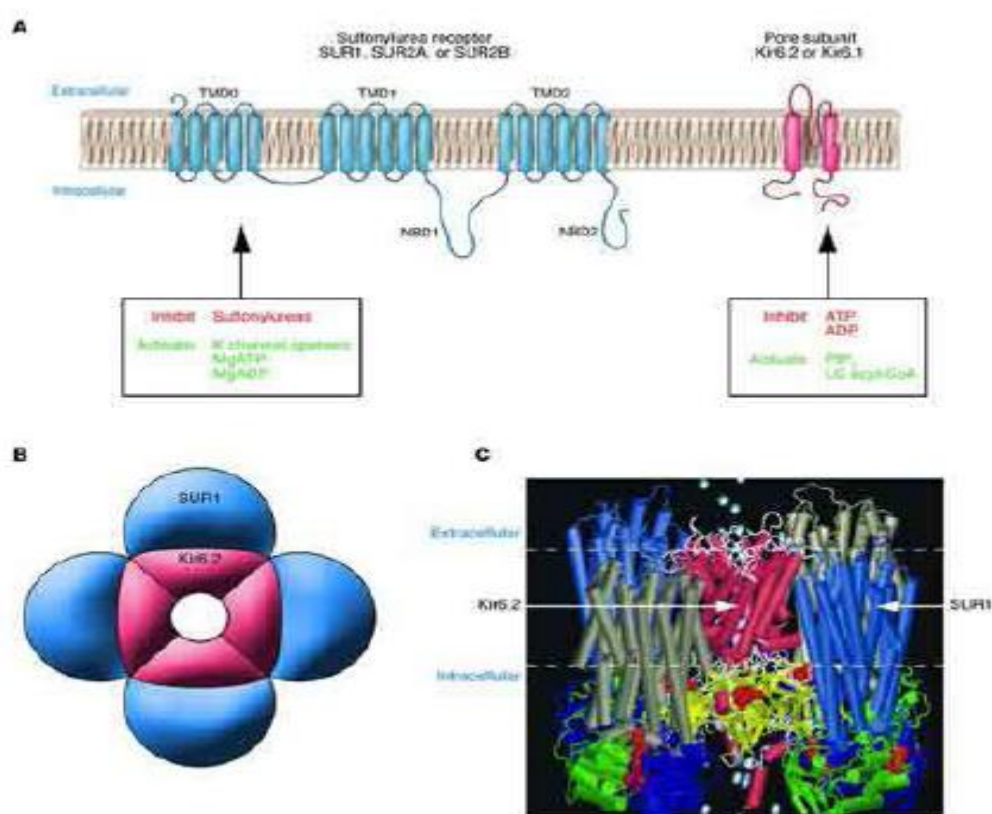
## 1.5 Effetti cellulari e molecolari di $\text{H}_2\text{S}$

$\text{H}_2\text{S}$  partecipa alla regolazione omeostatica di numerosi sistemi biologici, quali il sistema cardiovascolare, neuronale, gastrointestinale, respiratorio, renale, epatico e riproduttivo. Grazie alla sua elevata lipofilia  $\text{H}_2\text{S}$  raggiunge facilmente i suoi bersagli molecolari, attraversando la membrana plasmatica, il citosol o gli organelli intracellulari. In seguito alla sua reattività chimica,  $\text{H}_2\text{S}$  interagisce con numerose macromolecole in diversi tipi di cellule che utilizzano  $\text{H}_2\text{S}$  come molecola di segnalazione specifica selettiva e potente.

### 1.5.1 Interazioni con canali ionici

Numerosi effetti cellulari di  $\text{H}_2\text{S}$  sono dovuti alle sue interazioni con i canali ionici espressi sulla membrana citoplasmatica. Il canale del potassio ATP-sensibile ( $\text{KATP}$ ) è

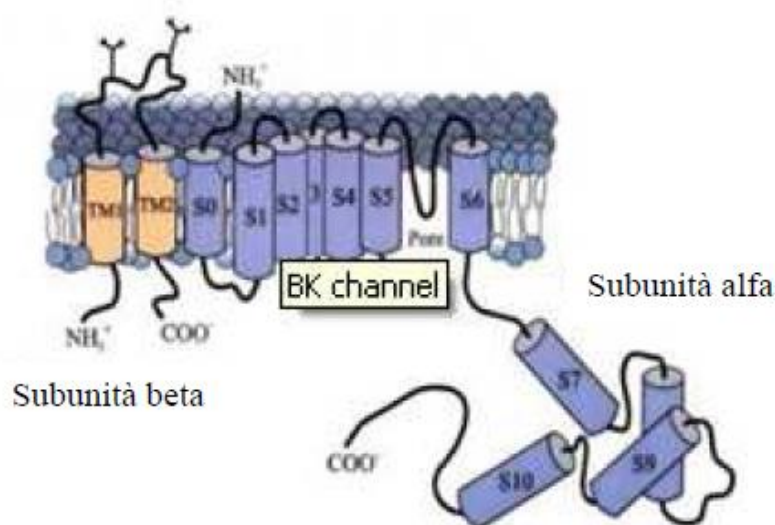
stato il primo bersaglio molecolare identificato [7]. L'attivazione di canali K<sub>ATP</sub> indotta da H<sub>2</sub>S è stata osservata nel sistema cardiovascolare, endocrino, respiratorio, nervoso e gastrointestinale. Sembra che più subunità dei canali K<sub>ATP</sub> vengano modificate da H<sub>2</sub>S. È stato dimostrato che H<sub>2</sub>S agisce specificamente sulla subunità SUR1 (o recettore sulfonilurea 1 o ABCC8) del canale K<sub>ATP</sub> tramite il legame con i residui amminoacidici Cys6 e Cys26 della subunità N-terminale del SUR1 [8].



**Figura 3. Struttura dei canali K<sub>ATP</sub>.**

Anche i canali del calcio voltaggio-dipendenti (VDCCs) sono stati identificati come potenziali target dell'H<sub>2</sub>S. L'interazione di H<sub>2</sub>S con tali canali provoca l'inibizione delle correnti VDCC [9]. Gli effetti di H<sub>2</sub>S sui canali voltaggio-dipendenti sembrano essere tessuto specifici. Negli ultimi anni, studi di fisiologia vascolare hanno permesso di identificare H<sub>2</sub>S come un fattore di iperpolarizzazione di derivazione endoteliale

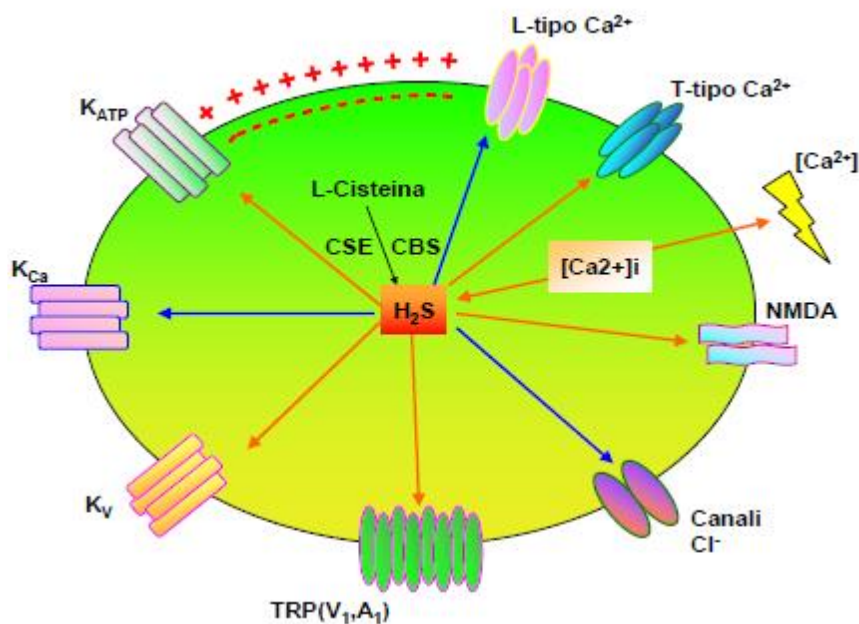
(EDHF) [10,11]. Tale mediatore è infatti responsabile dell'attivazione dei canali per il potassio calcio-dipendenti  $SK_{Ca}$  e  $IK_{Ca}$ ;



**Figura 4. Struttura dei canali  $K_{Ca}$  (formati da due subunità, alfa e beta).**

Questo effetto è stato confermato da un recente studio condotto sul muscolo liscio dell'endotelio e sulle arterie mesenteriche di topo. La co-somministrazione di caribdotossina eapamina [12], due bloccanti selettivi dei canali  $IK_{Ca}$  e  $SK_{Ca}$  non sono capaci di bloccare gli effetti vasodilatatori di EDHF lasciando ipotizzare l'attivazione indiretta legata all'  $H_2S$ .

Ma l'interazione di  $H_2S$  non è limitata solo ai canali sopra citati, ed inoltre  $H_2S$  non ha il solo ruolo di attivazione, dal momento che i canali ionici si differenziano per la loro composizione aminoacidica, per la loro dipendenza dal voltaggio, per i meccanismi di apertura, la selettività verso gli ioni e la sensibilità a diverse molecole segnale endogene. Pertanto le risposte di tali canali all'esposizione al solfuro d'idrogeno possono variare. È stato dimostrato infatti, che i canali per il potassio delayed-rectifier nelle cellule muscolari murine dello stomaco, vengono inibiti da  $H_2S$  [13], mentre i canali per il potassio sensibili alla 4-aminopiridina (4-AP) nelle cellule del muscolo liscio dell'arteria coronarica del ratto possono essere attivate da  $H_2S$  [14]. E' stato inoltre osservato che  $H_2S$  attiva anche i canali per il cloruro, i canali voltaggio dipendenti del sodio Na, e i recettori canali transienti TRPV1 e TRPA1, sensibili al potenziale dei cationi in diversi tessuti [15].



**Figura 5. Effetti di  $H_2S$  sui canali ionici. Effetti stimolatori (freccie rosse), ed effetti inibitori (freccie blu).**

Dal momento che non si conoscono le concentrazioni fisiologiche del solfuro di idrogeno endogeno nella circolazione o nei vari tipi cellulari, molti degli studi sopracitati, non possono essere utilizzati come evidenza scientifica di un ruolo fisiologico di  $H_2S$  nella regolazione dei diversi canali ionici. Infatti, stabilire un ruolo fisiologico di  $H_2S$  richiederebbe una comparazione delle caratteristiche dei canali ionici in presenza e in assenza di  $H_2S$  endogeno. Questa considerazione dovrebbe essere tenuta in considerazione in tutti gli studi in cui vengono esaminati i donatori di  $H_2S$  al fine di individuare le azioni fisiologiche di  $H_2S$ .

### **1.5.2 Interazioni con i classici secondi messaggeri**

Sebbene il solfuro d'idrogeno possa agire direttamente sulle proteine bersaglio senza l'intervento di secondi messaggeri, questo trasmettitore gassoso condiziona anche i livelli di molti secondi messaggeri noti. L'inibizione non selettiva delle fosfodiesterasi (PDEs) da parte di  $H_2S$  porta ad una minore degradazione del GMP ciclico e AMP ciclico, e di conseguenza induce l'aumento dei livelli di  $GMP_c$  e  $AMP_c$ .

Il calcio intracellulare libero è un altro secondo messaggero che svolge un ruolo critico nella trasduzione del segnale cellulare. Attraverso i suoi effetti sui canali ionici della membrana plasmatica e sulle riserve di calcio,  $H_2S$  può aumentare i livelli di calcio intracellulare nelle cellule dell'endotelio vascolare stimolando l'ingresso di calcio o rilasciando il calcio da una riserva intracellulare attivabile dall'ATP [16]. L'aumento dei livelli di calcio intracellulare induce l'attivazione di molte vie di trasduzione del segnale ed enzimi calcio-dipendenti, con conseguenti effetti sulla proliferazione e funzionalità endoteliale.

### 1.5.3 S-sulfidrazione delle proteine

Il solfuro d'idrogeno ( $H_2S$ ), analogamente all'ossido nitrico (NO) è capace di interagire con i gruppi sulfidrilici di alcune proteine. In particolare, NO lega covalentemente i gruppi sulfidrilici (-SH) liberi dei residui di cisteina delle proteine bersaglio per formare s-nitrosotioi. Queste proteine S-nitrosilate hanno spesso una ridotta funzionalità. Al contrario, la S-sulfidrilazione di gruppi tiolici a basso peso molecolare o dei residui di cisteina ad opera dell' $H_2S$  porta alla formazione di proteine con gruppi persolfuro (-SSH) [17] che contrariamente alle proteine funzionalizzate con il gruppo nitrosilico, sono invece proteine che spesso risultano attivate. Per esempio, la Kelch-like ECH-associated proteina 1 (KEAP1) è un regolatore negativo dell'attività del fattore eritroide nucleare Nrf2. La sulfidrilazione condotta dal solfuro d'idrogeno su KEAP1 a livello di Cys-151 facilita la dissociazione di Keap1 da Nrf2, portando così ad un miglioramento delle risposte antiossidanti mediate da Nrf2 [18].

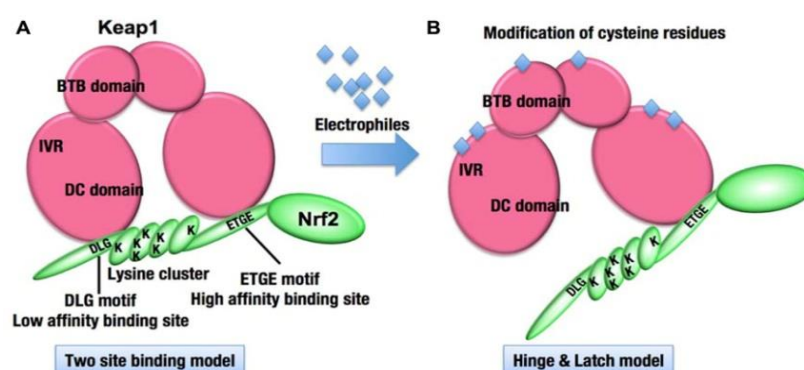


Figura 6. Dissociazione di Keap1 da Nrf2.

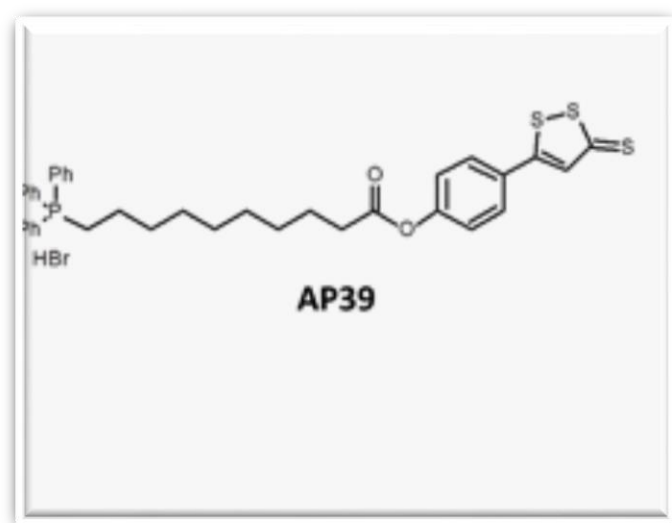
La modifica post-trasduzionale del fattore nucleare  $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ ) rappresenta un altro esempio della differenza negli effetti funzionali indotti rispettivamente dalla S-nitrosilazione e dalla S-sulfidrilazione. NF- $\kappa B$  è un fattore di trascrizione che regola l'espressione di molti geni che si attivano in seguito all'inflammazone o all'apoptosi. La S-nitrosilazione del residuo Cys38 della subunità p65 di NF- $\kappa B$  inibisce il legame di NF- $\kappa B$  ai siti responsivi della cisteina nella regione promotrice del gene che codifica per l'enzima iNOS (NO sintasi inducibile), causando una ridotta espressione [19]. La S-sulfidrilazione dello stesso residuo di cisteina, potenzia il legame di NF- $\kappa B$  alla proteina ribosomiale S3, che aumenta l'attività trascrizionale di p65 nel nucleo. Di conseguenza, l'apoptosi cellulare è ampiamente inibita. Per la regolazione del processo di trasduzione del segnale, sono richiesti entrambi i meccanismi di "turn-on" e "turn-off". Per esempio, la rimozione di NO dalle proteine S-nitrosilate si verifica attraverso il processo di de-nitrosilazione. La S-nitroso-glutatione reduttasi (GSNOR), un enzima per la de-nitrosilazione, riduce il prodotto della S-nitrosilazione delle proteine, GSNO, a glutatione idrossisulfonamide [20].

Attualmente sono ancora poco conosciuti gli enzimi coinvolti nelle reazioni di de-sulfidrilazione delle proteine. È stato dimostrato che la persolfuro deidrogenasi mitocondriale (ETHE1) catalizza in vitro la conversione del persolfuro nel glutatione (GSSH) in solfito. Questo processo ha importanti implicazioni per il metabolismo dei solfuri nei mitocondri e per il bilanciamento delle reazioni di ossido-riduzione [21]. Tuttavia, il substrato fisiologico di ETHE1 non è conosciuto, sebbene il legame col persolfuro nel sito attivo del peptide della solfuro-chinone ossidoreduttasi potrebbe essere un candidato. Inoltre, poco si conosce sulla de-sulfidrilazione delle proteine S-sulfidrilate nel citosol o negli organelli non mitocondriali. Si può supporre, comunque, che le proteine S-sulfidrilate possano essere de-sulfidrilate in presenza di un eccesso di agenti riducenti e, di conseguenza, il livello dell'ossigeno costituisce un fattore importante nei processi di de-sulfidrilazione.

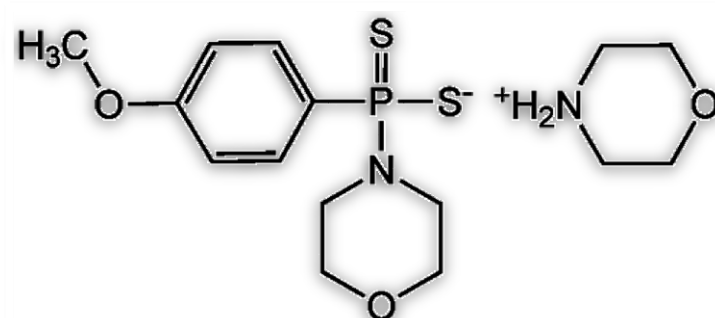


#### 1.5.4 Ruolo nel bilanciamento delle ossido-riduzioni

L'aumento dello stress ossidativo e/o la ridotta attività di specie antiossidanti in diverse condizioni patologiche è responsabile della disomeostasi fisiologica tra specie ossidanti e antiossidanti a cui seguono danni alle molecole e alle cellule. L'azione protettiva antiossidante di  $H_2S$  è stata ben stabilita, in particolare per il sistema cardiovascolare. Nelle colture di cellule muscolari lisce vascolari, lo stress ossidativo indotto da alti livelli di omocisteina o metilgliossale è stato significativamente ridotto da NaHS in concentrazioni pari a 30-90  $\mu M$  [22]. Inoltre, l'accumulo dei prodotti di perossidazione nelle cellule endoteliali della vena ombelicale umana (HUVECs) risulta inibito da NaHS con concentrazioni pari a 1-20  $\mu M$ ; anche la citotossicità endoteliale mediata dal perossido di idrogeno e dalle LDL ossidate è similmente inibita da NaHS a queste concentrazioni. Sebbene la rilevanza fisiologica dell'effetto antiossidante di  $H_2S$  a queste concentrazioni non sia chiara, il valore terapeutico dei donatori di  $H_2S$  in questo ambito è certamente ovvio. Oltre alla sua natura riducente,  $H_2S$  influenza l'equilibrio tra lo stato ossidante e quello antiossidante. L'espressione dell'enzima antiossidante tioredoxina 1 nelle cellule dell'endotelio vascolare è sovraregolato da  $H_2S$  [23], mentre l'espressione della NAD(P)H-ossidasi, una fonte essenziale di specie ossidanti extramitocondriali, è sottoregolata nelle cellule osteoblastiche che sono state esposte a  $H_2S$  [24]. La produzione di glutathione (GSH), noto scavenger dei radicali liberi, è anch'essa aumentata da  $H_2S$ . Come abbiamo già visto in precedenza, la S-sulfidrilazione di KEAP1 sui residui di Cys151 determina la traslocazione nucleare di Nrf2, con conseguente aumento del legame di Nrf2 agli elementi antiossidanti (ARE), ed un incremento della trascrizione mediata dagli elementi ARE di quei geni coinvolti nella sintesi e nel mantenimento dei corretti livelli di glutathione. Il conseguente aumento dei livelli di GSH contribuisce agli effetti protettivi di  $H_2S$  contro l'invecchiamento cellulare indotto dallo stress ossidativo. Il mitocondrio è la fonte primaria dei radicali liberi dell'ossigeno ed è l'organulo che è maggiormente sottoposto allo stress ossidativo. Lo stress ossidativo sopprime il trasporto elettronico mitocondriale e la bioenergetica, ma questi effetti possono essere contrastati da  $H_2S$  esogeno [25]. Di recente è stato riportato che concentrazioni nanomolari di un nuovo donatore di  $H_2S$  specifico per i mitocondri, AP39 (fig.7), inibisce in vitro il danno ossidativo nelle cellule endoteliali dei piccoli vasi sanguigni [26]. GYY4137 (fig.8), un donatore di  $H_2S$  a rilascio prolungato non specifico per i mitocondri, ha prodotto effetti protettivi simili a quelli prodotti da AP39, ma solo ad una concentrazione mille volte più elevata di quella di AP39 [27].



**Figura 7. Struttura chimica del composto AP39.**

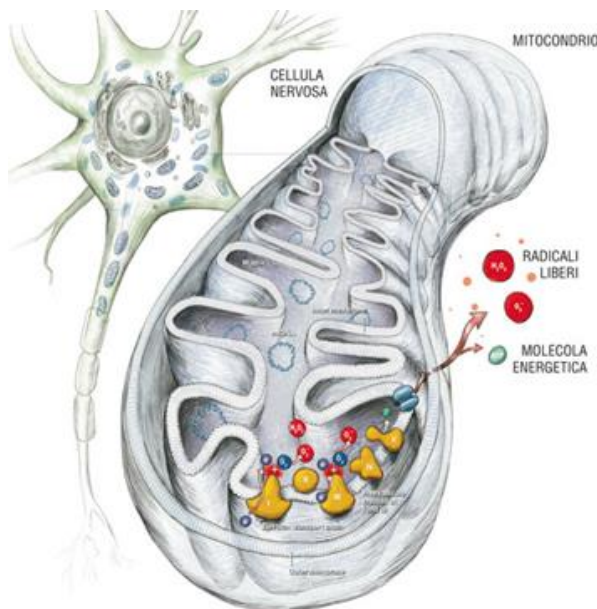


**Figura 8. Struttura chimica del GYY4137.**

### 1.5.5 La captazione dell'ossigeno e la bioenergetica mitocondriale

In condizioni di ipossia, l'ossidazione di  $H_2S$  nei mitocondri è fortemente ridotta, con conseguente innalzamento dei livelli di  $H_2S$ . Sembra che tessuti differenti gestiscano i cambiamenti della pressione parziale dell'ossigeno in modo diverso modificando la produzione e l'ossidazione di  $H_2S$ , oltre che cambiando la loro risposta ad  $H_2S$ . Nelle cellule

dei vasi  
l'ipossia o il  
calcio porta  
trasferimento  
dal citosol ai  
produce  $H_2S$   
cisteina come  
è stato osservato  
dello stress  
CBS, espresso a  
mitocondri delle



muscolari lisce  
sanguigni,  
sovraccarico di  
anche al  
dell'enzima CSE  
mitocondri, dove  
utilizzando L-  
substrato. Inoltre,  
che a seguito  
ipossico l'enzima  
livello dei  
cellule

pancreatiche non viene degradato. Il conseguente accumulo della proteina CBS nei mitocondri porta ad un aumento della produzione mitocondriale di  $H_2S$  [6]. Per quanto riguarda la produzione bioenergetica, in condizioni di ipossia la sovraregolata produzione di  $H_2S$  -che può agire da donatore di elettroni nella catena respiratoria mitocondriale- contribuisce alla generazione di bioenergia [28], pertanto, per fronteggiare un'emergenza ipossica, la produzione mitocondriale di ATP può essere mantenuta dai livelli di  $H_2S$ , incrementati proprio dall'ipossia.

## CAPITOLO 2

### **H<sub>2</sub>S nei processi patologici**

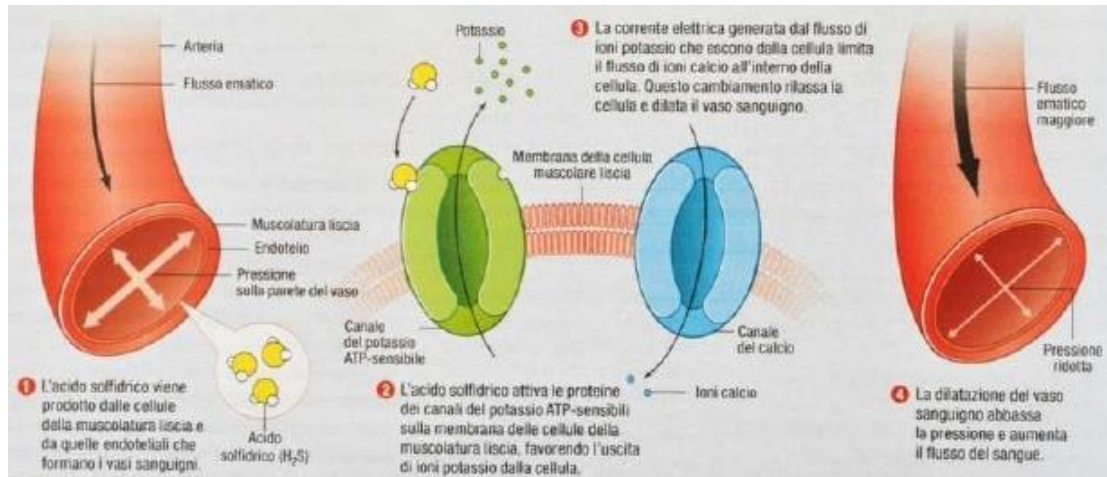
I livelli di H<sub>2</sub>S contribuiscono all'omeostasi dell'organismo; di conseguenza una maggiore o minore sintesi endogena di H<sub>2</sub>S è spesso associata a diverse patologie. Tra queste si ritrovano quelle che coinvolgono i sistemi cardiovascolare, endocrino, gastrointestinale e nervoso.

#### **2.1 Ipertensione e rimodellamento vascolare**

In qualità di fattore per l'iperpolarizzazione (EDHF), H<sub>2</sub>S induce il rilassamento di molti vasi sanguigni del circolo sistemico. Quando è prodotto nelle cellule muscolari lisce o in altre cellule non-endoteliali, H<sub>2</sub>S induce vasodilatazione per azione diretta sulle cellule muscolari lisce [29]. I primi studi di Zhao et al. [29] sui topi avevano mostrato che l'inibizione farmacologica di CSE induceva un aumento della pressione sanguigna, mentre in topi CSE-knockout è stata osservata la comparsa dell'ipertensione età-dipendente che era in gran parte dovuta alla ridotta produzione di H<sub>2</sub>S e al rilassamento endotelio-dipendente delle resistenze periferiche. Similmente ai topi CSE-knockout, i ratti con un'ipertensione spontanea (SHRs) mostravano una comparsa dell'ipertensione che si correlava alla ridotta espressione di CSE e alla produzione di H<sub>2</sub>S nel tessuto aortico. Il trattamento dei topi CSE-knockout con NaHS a concentrazioni di 3.9 µmol per kg, 19,5 µmol per kg e 39 µmol per kg (in infusione endovenosa) o dei topi SHR con NaHS a concentrazioni pari a 56 µmol per kg (somministrazione intraperitoneale) annulla l'insorgenza dell'ipertensione, riduce il danno vascolare ed impedisce il rimodellamento vascolare (Figura 9) [30,4,5].

E' stato approfondito anche il ruolo di H<sub>2</sub>S nell'ipertensione gestazionale. L'ipertensione è una delle principali caratteristiche della pre-eclampsia (una patologia che interessa le donne in gravidanza, ma che non ha una chiara eziologia). Il solfuro d'idrogeno endogeno è necessario per la sana irrorazione vascolare della placenta, mentre una ridotta attività di CSE o di H<sub>2</sub>S può contribuire alla patogenesi della pre-eclampsia. Nella cavia incinta, l'inibizione di CSE con propargil-glicina ha causato ipertensione e promosso una vascolarizzazione anomala e complessa della placenta [29].

Le donne con la pre-eclampsia mostrano ridotti livelli di  $H_2S$  e ridotta espressione di CSE nella placenta rispetto ai controlli della stessa età in stato di gravidanza.



**Figura 9. Dilatazione del vaso sanguigno ad opera dell' $H_2S$ .**

## 2.2 Angiogenesi

$H_2S$  aumenta la proliferazione e la migrazione delle cellule endoteliali vascolari, la formazione dei microvasi e la guarigione delle ferite e delle ulcere sia in vivo che in vitro. Si pensa che questi effetti pro-angiogenici di  $H_2S$  siano mediati attraverso la fosforilazione di AKT, della chinasi regolata dai segnali extracellulari (ERK) e di p38, oltre che attraverso l'attivazione dei canali  $K_{ATP}$  [31]. L'interazione dell' $H_2S$  con il fattore vascolare di crescita endoteliale (VEGF) costituisce un altro importante meccanismo di pro-angiogenesi. I ratti trattati con NaHS (50  $\mu\text{mol}$  per kg, due volte al giorno) hanno mostrato aumentati livelli plasmatici di VEGF ed un'espressione renale sovraregolata del mRNA che codifica per VEGF [32]. A sua volta, VEGF stimola il rilascio di  $H_2S$  dalle cellule endoteliali vascolari. Tuttavia,  $H_2S$  e VEGF stimolano l'angiogenesi sia individualmente che in modo sinergico.

Anche l'interazione tra  $H_2S$  e NO può condizionare l'angiogenesi [33,34]. È stato dimostrato che NaHS promuove la fosforilazione dell'ossido-nitrico sintasi nelle colture HUVEC, portando ad un aumento della produzione di NO, che contribuisce

ulteriormente alla proliferazione delle cellule endoteliali e alla formazione del vaso sanguigno (figura 10) [34].



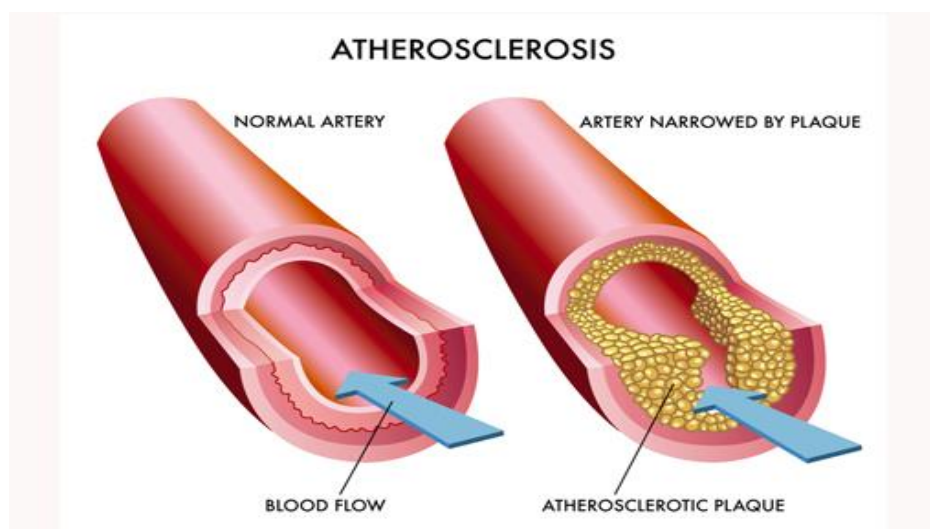
**Figura 10. Esempio di Angiogenesi.**

### **2.3 Aterosclerosi**

L'aterosclerosi è una malattia circolatoria cronica che è caratterizzata dallo sviluppo di placche lipidiche o di colesterolo sulla superficie interna dei vasi sanguigni di medie e grosse dimensioni (figura 11). La patogenesi dell'aterosclerosi non è completamente conosciuta, ma recenti studi hanno indicato che un alterato metabolismo di  $H_2S$  è coinvolto sia all'inizio che nella fase più avanzata della patologia. Mani et al. [35] hanno dimostrato che i topi CSE-knockout, alimentati con una dieta aterogena, hanno presentato placche lipidiche nell'aorta, un aumento dello stress ossidativo, dell'espressione delle molecole di adesione, ed un potenziamento nella proliferazione della tonaca intima dell'aorta, perciò il trattamento di questi, con  $H_2S$  ha mostrato effetti anti-aterosclerotici attraverso: l'abbassamento dei livelli di LDL ossidate, la riduzione di calcificazione e dell'infiammazione vascolare; e l'inibizione dell'adesione dei monociti alle cellule endoteliali.

Una migliore comprensione del ruolo anti-aterosclerosi di  $H_2S$  ha agevolato l'avanzamento delle terapie basate su  $H_2S$  aventi come bersaglio proprio l'aterosclerosi. Nei topi APOE-knockout, il trattamento con NaHS (56  $\mu\text{mol}$  pro kg/die, in somministrazione intraperitoneale) o di GYY4137 (133  $\mu\text{mol}$  pro kg/die, in somministrazione intraperitoneale) riduce l'entità della placca aterosclerotica e ripristina parzialmente il rilassamento endotelio-dipendente dell'aorta, indotto dall'acetilcolina

[36,37]. I donatori di H<sub>2</sub>S sopprimono anche: l'espressione della molecola d'adesione intercellulare (ICAM1), del fattore di necrosi tumorale (TNF) e dell'interleuchina 6 (IL-6) nell'aorta; l'espressione del recettore 1 per le chemochine CX3C (CX3CR1) e del suo ligando (CX3CL1) nei macrofagi e nelle lesioni delle placche; e la generazione di superossido nell'aorta di questi animali [36,37,38]. Inoltre, in questi topi, il trattamento precoce con NaHS alle dosi di 1 mg per kg al giorno (somm. Intraperitoneale) contro il danno aterosclerotico ha generato vantaggi terapeutici migliori rispetto a quando NaHS veniva somministrato dopo la completa diffusione della patologia [38].



**Figura 11. A sinistra arteria normale, a destra arteria con placche.**

## **2.4 Anomalie del metabolismo lipidico e patologie epatiche**

Il fegato svolge un ruolo cruciale nel metabolismo dei lipidi, e la produzione epatica di H<sub>2</sub>S risulta fondamentale nella regolazione del metabolismo dei grassi. Infatti, carenze genetiche di CBS o di CSE portano alla iperomocisteinemia. I topi privi di CBS (CBS-knockout) che sono alimentati con cibo normale, mostrano un metabolismo anormale dei lipidi, con un aumento dei livelli sierici ed epatici di trigliceridi e acidi grassi non essenziali, e presentano inoltre fibrosi epatica spontanea e steatosi. Tuttavia, la morfologia e la funzionalità del fegato sembrano essere normali nei topi CSE-knockout normalmente alimentati [39]. L'impatto della carenza di CSE sul metabolismo lipidico si rileva solo dopo che questi topi vengono alimentati con una dieta aterogenica ricca di grassi: con un regime alimentare così aterogenico, essi mostrano aumentati livelli

plasmatici di colesterolo totale e di LDL, una riduzione di lipoproteine ad alta densità (HDL) ed uno sviluppo precoce di aterosclerosi [35]. Sorprendentemente, nell'uomo, i livelli plasmatici di H<sub>2</sub>S sono positivamente correlati con il colesterolo HDL, e negativamente correlati con il rapporto fra LDL e HDL [40]. L'alterata regolazione dell'espressione di CSE e la riduzione della concentrazione di H<sub>2</sub>S nel fegato sono comuni conseguenze osservate nei ratti affetti da patologie biliari e/o epatiche (i.e. cirrosi) [41,42]. Diversi studi hanno mostrato che una terapia suppletiva con H<sub>2</sub>S in queste patologie epatiche sembra avere effetti benefici [41-43].

## **2.5 Diabete**

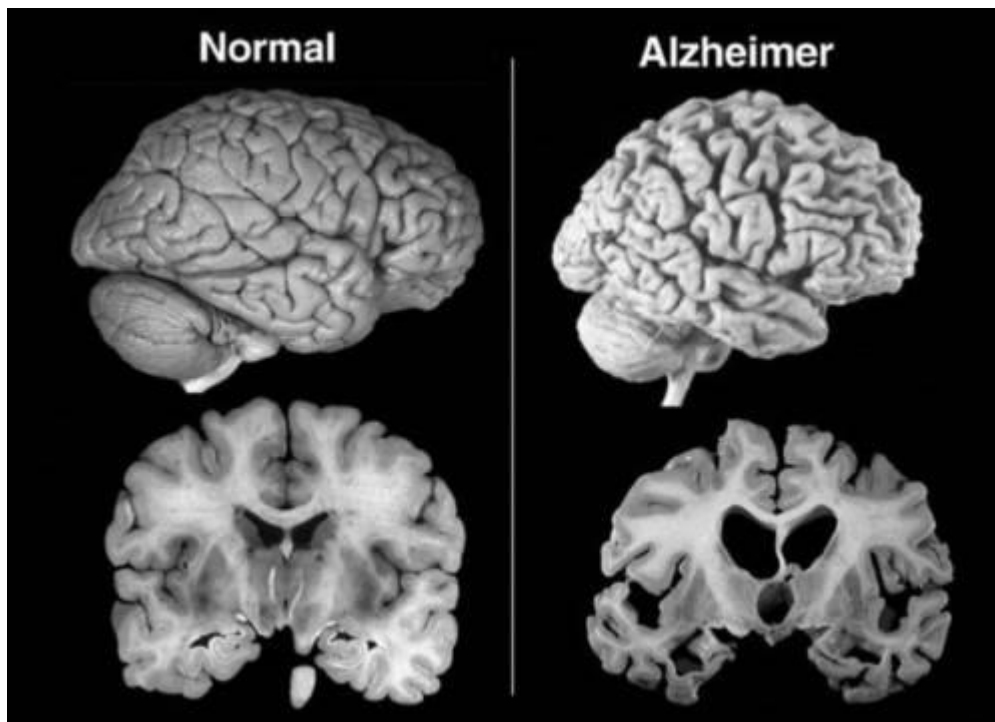
Il diabete mellito è causato dalla ridotta biodisponibilità d'insulina nel pancreas e/o da una ridotta sensibilità all'insulina nelle cellule dei tessuti periferici. L'alterato metabolismo di H<sub>2</sub>S nel pancreas e nei tessuti periferici è implicato sia nella patogenesi del diabete che nelle patologie ad esso correlate. La sovraespressione di CSE e la conseguente sovrapproduzione di H<sub>2</sub>S nelle cellule  $\beta$ -pancreatiche, come evidenziato nei modelli murini di diabete genetico (ratti diabetici di Zucker), costituiscono fattori patogenetici per il diabete. Sebbene non sia stato direttamente dimostrato in vivo, H<sub>2</sub>S ha un effetto citotossico sulle  $\beta$ -cellule pancreatiche in vitro. E' stato infatti osservato che a seguito del trattamento con H<sub>2</sub>S le colture cellulari secernenti insulina INS-1E vanno maggiormente incontro ad apoptosi [44]. Il rilascio pancreatico di insulina è correlato alla stimolazione, indotta da H<sub>2</sub>S, dei canali K<sub>ATP</sub> nelle  $\beta$ -cellule e alla conseguente iperpolarizzazione della membrana cellulare [45]. Oltre a questo è stato dimostrato che H<sub>2</sub>S inibisce i canali di voltaggio dipendenti di tipo L nelle  $\beta$ -cellule pancreatiche del topo [8]. Tale effetto riduce l'ingresso di calcio e la secrezione di insulina dalle cellule  $\beta$  [8]. Una volta che il diabete è conclamato, possono insorgere varie complicanze che includono la cardiomiopatia, la nefropatia e i disordini vascolari associati alla disfunzione vascolare. Queste complicazioni sono strettamente correlate alla carenza sistemica di H<sub>2</sub>S, poiché le cellule iperglicemiche ossidano e consumano più H<sub>2</sub>S [46,47]. La sovraespressione di CSE o il trattamento con H<sub>2</sub>S previene la disfunzione endoteliale indotta da alti livelli di glucosio in colture cellulari microvascolari; migliora l'alterato rilassamento endotelio-dipendente dell'aorta in vitro ed ex-vivo [48] e accelera la guarigione delle ferite ripristinando la funzionalità delle cellule progenitrici endoteliali e l'attivazione del segnale mediato dall'angiopoietina 1



[49]. In particolare, nei ratti con diabete indotto da streptozocina, il trattamento con NaHS a 100  $\mu\text{mol}$  pro kg/die (somm. Intraperitoneale) ha mostrato di migliorare la funzionalità cardiaca, proteggendo i cardiomiociti dal danno ossidativo e preservando la funzionalità mitocondriale [50].

## **2.6 Patologie neurodegenerative**

I livelli cerebrali di  $\text{H}_2\text{S}$  in soggetti con il morbo di Alzheimer sono più bassi rispetto ai soggetti sani della stessa età, sebbene l'entità dell'espressione di CBS tra questi gruppi non siano differenti. Poiché la malattia di Alzheimer è associata ad una ridotta produzione di solfuro d'idrogeno, la ridotta disponibilità di tale mediatore potrebbe avere effetti neurotossici con conseguente aumento dei processi neuroinfiammatori indotti dalla proteina  $\beta$ -amiloide, e aumento dello stress ossidativo [51]. Non è chiaro se i bassi livelli cerebrali di  $\text{H}_2\text{S}$  osservati nel morbo di Alzheimer siano una causa o una conseguenza della patologia. In un modello murino di demenza per ischemia vascolare è stato osservato che i livelli plasmatici di  $\text{H}_2\text{S}$  erano più bassi, e che l'iniezione intraperitoneale di NaHS (14  $\mu\text{mol}$  per kg) proteggeva selettivamente contro il danno neuronale con conseguente miglioramento della performance di apprendimento e memorizzazione [52].



**Figura 12. A sinistra cervello in perfetta salute, a destra cervello affetto da Alzheimer.**

Il morbo di Parkinson è un altro disturbo neurodegenerativo in cui potrebbe essere implicato il metabolismo di  $H_2S$ . In un modello murino di malattia di Parkinson, i livelli di solfuro d'idrogeno nella substantia nigra e nello striatum erano significativamente più bassi di quelli dei topi controllo [53].  $H_2S$  che era stato dato per iniezione o inalazione ostacolava o preveniva le anomalie generate dalla patologia, comprese la disfunzione dei movimenti e l'attivazione della microglia [53].

Inaspettatamente -data l'espressione dominante di CBS nel cervello-, un recente studio ha rivelato l'importanza di CSE per la manifestazione della corea di Huntington (HD), una patologia autosomica dominante associata a mutazioni nel gene che codifica la proteina huntingtina [3]. In questo studio, la mancanza di CSE è stata riscontrata nei tessuti cerebrali a livello dello striatum e della corteccia ma non nel cervelletto dei pazienti con HD, giustificando la relativa suscettibilità di queste regioni al danno indotto dalla malattia. Inoltre, nei modelli murini di HD (topi Q175 e R6/2HD), l'espressione di CSE era sottoregolata nello striatum, nella corteccia, nell'ippocampo, nell'ipotalamo e nel tronco cerebrale, ma non nel cervelletto.

Nei danni da trauma al midollo spinale, il danno neuronale è inizialmente causato dal trauma stesso, anche se la reazione infiammatoria che segue può peggiorare il danno stesso. In un modello murino di trauma al midollo spinale, Campolo et al. [54] hanno dimostrato le potenzialità dell'impiego di  $H_2S$  per ridurre la componente infiammatoria del danno, e per accelerare il recupero della funzionalità motoria. Il trattamento post traumatico con un farmaco antiinfiammatorio non steroideo, come il naprossene, potenzia il recupero della funzionalità motoria e riduce l'infiammazione nel midollo spinale. Lo stesso esperimento condotto su topi trattati con un derivato del naprossene che rilasciava  $H_2S$  (ATB-346), ha mostrato un più rapido recupero della mobilità ed un marcato miglioramento degli effetti antiinfiammatori [54].

## **2.7 Disturbi gastrointestinali**

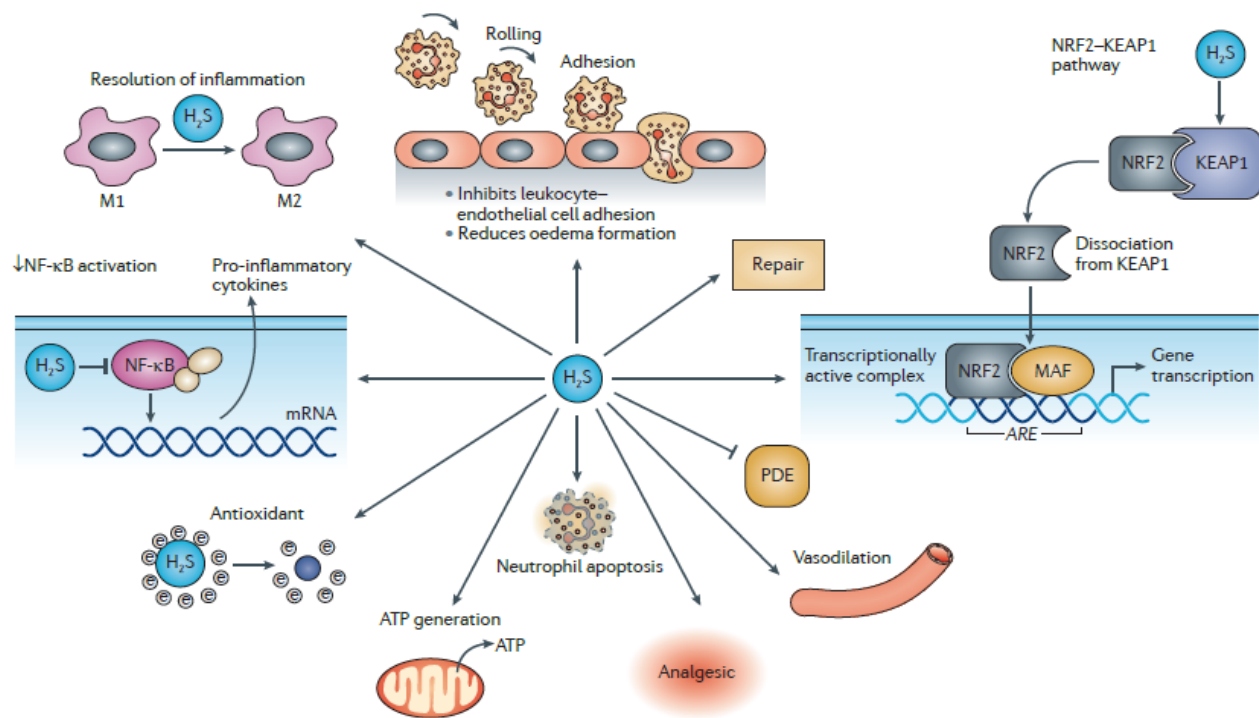
Il solfuro d'idrogeno, compreso quello prodotto dagli enterobatteri, è stato identificato come mediatore di diverse attività fisiologiche nell'apparato digerente. Ci sono prove emergenti dell'utilità dei donatori di  $H_2S$  nella terapia di diversi disturbi gastrointestinali, in particolare di quelli associati all'infiammazione (figura 13). Il ruolo di  $H_2S$  nella modulazione del dolore intestinale è controverso: dati contrastanti suggeriscono che il solfuro d'idrogeno promuove ed inibisce la nocicezione [55]. Ad ogni modo, queste differenze possono essere collegate al modello impiegato, ai tipi e alle dosi dei donatori di  $H_2S$  che vengono utilizzati [55]. Diversi studi hanno suggerito potenti effetti anti-nocicettivi dei donatori di  $H_2S$  nei modelli murini di dolore viscerale [55]. Per esempio, il dolore indotto nel ratto dalla distensione del colon è sostanzialmente attenuato da diversi donatori di  $H_2S$ , le cui azioni sono mediate, almeno in parte, dall'attivazione dei canali  $K_{ATP}$  [56]. In modo simile, il dolore indotto dalla distensione gastrica nei ratti viene marcatamente ridotto dai donatori di  $H_2S$  ed esacerbato da un inibitore dell'attività di CSE. Un sale di trimebutina (un farmaco oppioidi antispasmodico) a rilascio di  $H_2S$  ha dimostrato di essere sicuro e ben tollerato negli studi clinici di fase 1 (clinicaltrials. Govidentifier: NCT01738425) [57], ed è saggiato adesso come analgesico in trials clinici di fase 2 (clinicaltrials. Govidentifier: NCT01926444 e NCT02276768).

Il danno acuto alla parete dello stomaco può essere causato da certi farmaci (ad esempio i FANS), dallo stress e dall'ischemia e riperfusione gastrica.  $H_2S$  è un importante

mediatore della difesa della mucosa gastrica, che consiste nella capacità della mucosa gastrica di resistere al danno indotto da sostanze endogene ed esogene. L'inibizione farmacologica della sintesi di solfuro d'idrogeno incrementa la suscettibilità ai danni dello stomaco, mentre i donatori di  $H_2S$  (come NaHS o il disolfuro di diallile) possono proteggere lo stomaco da eventuali danni gastrolesivi [58]. Il meccanismo alla base dell'azione citoprotettiva di  $H_2S$  probabilmente coinvolge la sua abilità ad inibire l'adesione dei leucociti all'endotelio vascolare, un passaggio chiave nella patogenesi del danno provocato dai FANS sulla mucosa gastrica.  $H_2S$  può inoltre innescare la secrezione gastrica e duodenale di bicarbonato, che neutralizza l'eccesso di acido lesivo per la mucosa. Inoltre,  $H_2S$  aumenta il flusso sanguigno attraverso la mucosa gastrica, potenziandone la resistenza alla lesione [58]. I derivati dei FANS che rilasciano  $H_2S$  hanno dimostrato di produrre danni gastrointestinali di gran lunga inferiori a quelli prodotti dai classici FANS [59]. Nello specifico le ulcere gastriche, che penetrano nella sottomucosa della parete dello stomaco, richiedono molti giorni o settimane per guarire, e clinicamente la guarigione di tali ulcere può essere accelerata in una certa misura da farmaci che inibiscono la secrezione acida gastrica. Questa guarigione dipende parzialmente da  $H_2S$ , la cui sintesi è maggiore a livello delle ulcere, in quanto l'espressione di CSE e CBS è elevata. La somministrazione per via orale di L-cisteina o di donatori di solfuro d'idrogeno nei ratti con ulcera gastrica ha portato ad una significativa accelerazione della remissione dell'ulcera. Mentre i FANS sono noti per ritardare la guarigione dell'ulcera gastrica nell'uomo e nell'animale, i FANS che rilasciano solfuro d'idrogeno hanno dimostrato di indurre un'accelerazione nella guarigione delle ulcere nei topi [59].

E' stato dimostrato inoltre che il trattamento con NaHS, donatore di  $H_2S$ , riduce in maniera importante la severità del reflusso gastro-esofageo nei ratti, e l'inibizione di CSE in questi animali porta all'esacerbazione del danno tissutale [60]. I FANS inducono anche ulcere e sanguinamento nel piccolo intestino, e non sono disponibili trattamenti curativi o di prevenzione che si sono mostrati efficaci per questa condizione potenzialmente letale. La terapia col donatore di solfuro d'idrogeno, il disolfuro di diallile può sostanzialmente ridurre le patologie gastrointestinali indotte dai FANS nelle cavie, e i FANS che rilasciano  $H_2S$  inducono un danno trascurabile al piccolo intestino perfino quando i FANS sono cosomministrati con farmaci come aspirina o inibitori di pompa protonica, che possono aggravare le lesioni e il sanguinamento intestinale causato dai FANS [61].  $H_2S$  sembra avere un ruolo importante come anti-infiammatorio

e come molecola in grado di promuovere la guarigione del colon. Nella colite sperimentale nei ratti, la sintesi locale di  $H_2S$  è massivamente sottoregolata in sede di ulcerazione. In questo modello,  $H_2S$  promuove la risoluzione dell'infiammazione del colon e la guarigione dell'ulcera [62]. L'inibizione della sintesi di solfuro d'idrogeno nei ratti sani porta ad infiammazione della mucosa gastrointestinale, ad una ridotta espressione della ciclossigenasi 2 e conseguente riduzione della biosintesi di prostaglandine nella mucosa [59]. La somministrazione di donatori di  $H_2S$  (quali reagente di Lawesson, NaHS o il trisolfuro di diallile), a ratti o a topi affetti da colite, induce una rapida risoluzione dell'infiammazione ed una guarigione del tessuto colico danneggiato, così come una downregulation di citochine pro-infiammatorie e dell'espressione delle chemochine rispetto agli animali impiegati come controllo [63]. Una minor sintesi di solfuro d'idrogeno a livello del colon, risulta essere associata ad un marcato peggioramento della colite che può essere contrastato dalla somministrazione del solfuro di diallile come donatore di  $H_2S$ . I topi carenti di IL-10, che sviluppano spontaneamente colite, mostrano un simile difetto nella produzione di  $H_2S$  a livello del colon che può essere annullato dalla somministrazione di IL-10 [64]. Pertanto, ci sono prove sostanziali che suggeriscono che gli effetti antiinfiammatori o pro-guarigione di  $H_2S$  siano mediati in larga parte attraverso la downregulation dell'espressione di un certo gruppo di citochine pro-infiammatorie (per esempio IL-1 $\beta$ , TNF, interferone  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), IL-12 e IL-23) [64]. Inoltre, diversi studi hanno mostrato rilevanti effetti chemiopreventivi dei farmaci rilascianti  $H_2S$  nei modelli animali di cancro al colon. Al contrario, si pensa che un upregulation dell'espressione di CBS, ed il conseguente aumento della sintesi di solfuro d'idrogeno, giochino un ruolo chiave nella crescita del tumore al colon, in parte attraverso il controllo dell'angiogenesi.



**Figura 13. Bersagli antinfiammatori e citoprotettivi di  $H_2S$ .**

Si pensa che il solfuro d'idrogeno ( $H_2S$ ) agisca attraverso diversi sistemi di segnalazione o pathways, per ridurre l'infiammazione e per proteggere i tessuti dalle lesioni (ad esempio un'ulcera nel tratto gastrointestinale).  $H_2S$  può inibire l'adesione dei leucociti all'endotelio vascolare, lo stravasamento di leucociti e la conseguente formazione dell'edema. Può sostituire l'ossigeno nella conduzione della respirazione mitocondriale, attenuando in tal modo il danno tissutale legato allo stress ossidativo. L'abilità di  $H_2S$  di inibire l'attività delle fosfodiesterasi (PDEs) può contribuire alla sua capacità di rilassare il muscolo liscio vascolare, portando ad un potenziamento del flusso sanguigno. La risoluzione dell'infiammazione può essere accelerata da  $H_2S$  attraverso azioni come la promozione dell'apoptosi nei neutrofili, e l'indirizzamento della differenziazione dei macrofagi verso il fenotipo M2 (antinfiammatorio).  $H_2S$  può modulare l'attività di un numero di fattori di trascrizione: inibisce il fattore nucleare  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), provocando una ridotta produzione di citochine proinfiammatorie, e solfidrata la proteina 1 Kelch-like ECH-associated (KEAP1), che poi rilascia il fattore eritroide nucleare Nrf2, portando ad un aumento dell'espressione degli elementi per la risposta antiossidante (AREs).

## **2.8 Patologie genetiche umane legate agli enzimi per la sintesi di H<sub>2</sub>S**

Mutazioni a carico del gene umano che codifica per CSE possono provocare cistationinuria ereditaria e ipercistationinemia. Allo stesso modo, errori innati nel gene per CBS sono associati alle patologie ereditarie iperomocisteinemia e omocistinuria. Oltre a provocare un incremento dei livelli di cistationina o di omocisteina nel sangue e nelle urine, queste patologie sono associate all'inflammatione sistemica, a complicazioni cardiovascolari e a danni ad altri organi. Al contrario, la sovraespressione del gene CBS è la principale causa della sindrome di Down, che è caratterizzata da bassi livelli di omocisteina nel sangue.

## CAPITOLO 3

### Donatori di H<sub>2</sub>S

Per studiare le proprietà fisiologiche e fisiopatologiche di H<sub>2</sub>S, è tipico l'uso diretto del gas H<sub>2</sub>S o NaHS in soluzioni acquose. Tuttavia il potenziale terapeutico di H<sub>2</sub>S sembra essere così limitato a causa delle difficoltà nell'ottenere precise concentrazioni controllate e a causa del possibile impatto tossico che H<sub>2</sub>S potrebbe dare in eccesso [65]. NaHS anche se ampiamente utilizzato come strumento di ricerca, è un donatore di breve durata d'azione che non imita il processo lento e continuo della produzione di H<sub>2</sub>S in vivo [65]. Inoltre, NaHS in soluzione acquosa può essere rapidamente ossidato da O<sub>2</sub>. Perciò vengono apportate modifiche tra il momento di preparazione della soluzione e il tempo dell'effetto biologico influenzando quindi notevolmente i risultati. A causa di questi limiti, gli agenti di rilascio di H<sub>2</sub>S sono considerati strumenti utili per lo studio degli effetti mediati da tale gas. Oltre al NaHS, anche i tioli biologici come la cisteina e il glutathione possono essere donatori di H<sub>2</sub>S. Un limite di questi noti donatori però, è che, il rilascio di H<sub>2</sub>S è troppo veloce per imitare una generazione fisiologica di H<sub>2</sub>S. In considerazione alle caratteristiche strutturali di questi composti, poco può essere fatto per modificare la loro struttura e controllare il rilascio di H<sub>2</sub>S. Pertanto, lo sviluppo di nuovi donatori di H<sub>2</sub>S con capacità di generare in maniera controllata tale gas, è fondamentale per questo settore. Ideali donatori di H<sub>2</sub>S dovrebbero rilasciarlo lentamente e in quantità moderate. I donatori dovrebbero essere composti stabili che possano essere facilmente manipolati dai ricercatori.

#### 3.1 S-Nitrosotioli

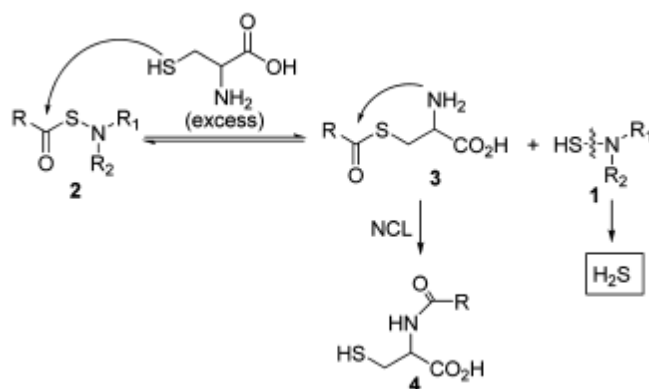
In recenti studi di S-nitrosotioli [66] è stato notato che il legame S-N è instabile e che in determinate condizioni potrebbe rompersi. Questa proprietà ha portato l'idea di sviluppare donatori lenti di H<sub>2</sub>S sulla base del legame S-N, dal momento che i composti N-mercapto (schema 1), esempio 1 potrebbero essere potenziali donatori di H<sub>2</sub>S [67].





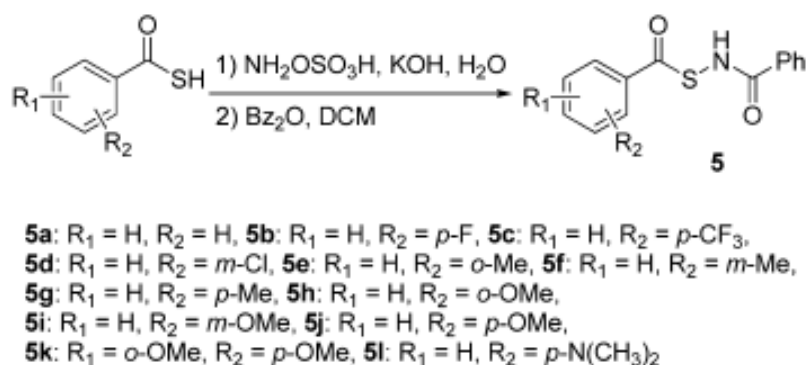
**Schema 1**

Quindi visto che i derivati N-SH sono specie instabili, un gruppo protettivo su SH potrebbe migliorare la stabilità. Inoltre il gruppo protettivo potrebbe consentire anche di progettare diverse strategie di attivazione per generare **1**, ottenendo così il rilascio di H<sub>2</sub>S controllato. Perciò come gruppo protettivo per la generazione di donatori di H<sub>2</sub>S basati sul gruppo N-mercapto, è stato utilizzato un gruppo acilico.



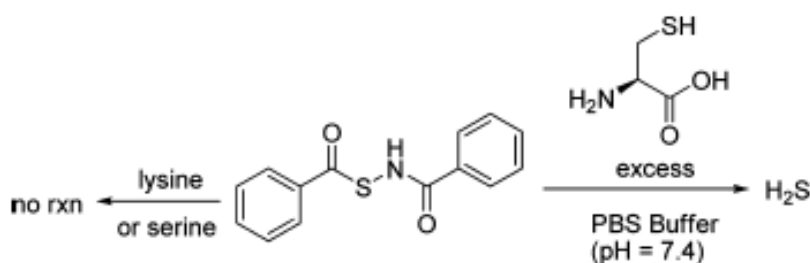
**Schema 2**

Come mostrato nello schema 2 composti come (**2**) reagiscono con la cisteina cellulare attraverso il legame chimico nativo (NCL) per la produzione del derivato (**1**) N-SH e successiva scissione del legame S-N in (**1**) e conseguente rilascio di H<sub>2</sub>S. Per testare questa idea una serie di derivati N- (tiobenzil) benzammidici(**5a**) sono stati preparati dai corrispondenti acidi tiobenzoici (schema 3) [67].



**Schema 3**

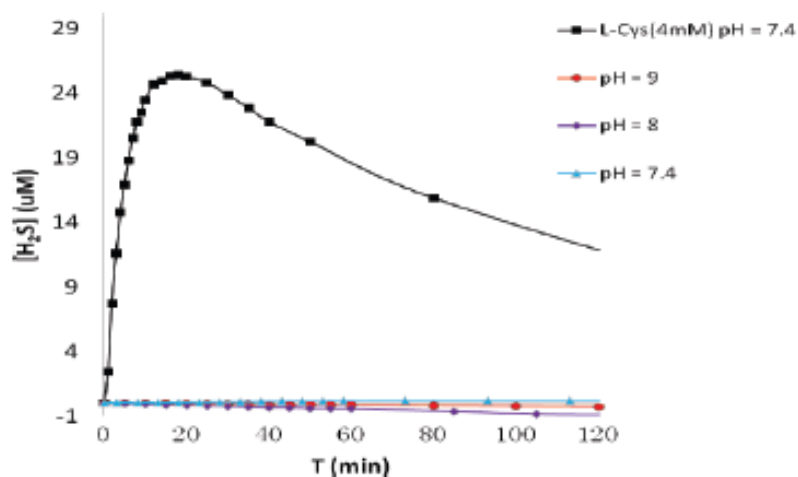
La presenza di diversi sostituenti lascia ipotizzare la possibilità di modulare la velocità di reazione dei composti **5** con cisteina, e di conseguenza il rilascio di  $\text{H}_2\text{S}$ . Composti **5a-l** hanno dimostrato di essere stabili nei tamponi acquosi. Come mostrato nello schema 4, non reagiscono come potenziali nucleofili cellulari quali gruppi  $-\text{OH}$  e gruppi  $-\text{NH}_2$ . Tuttavia, con la presenza di cisteina è stata osservata una degradazione tempo-dipendente dei donatori accompagnati dal rilascio di  $\text{H}_2\text{S}$  [67].



**Schema 4**

La formazione di  $\text{H}_2\text{S}$  è stata monitorata con un microelettrodo 2 mm  $\text{H}_2\text{S}$  selettivo (ISO-H2S-2; WPI) collegato ad un analizzatore di radicali liberi Apollo 1100 (WPI). Una tipica curva di generazione di  $\text{H}_2\text{S}$  a pH 7.4 viene mostrata nella Figura 14. In presenza di cisteina in eccesso, la concentrazione di  $\text{H}_2\text{S}$  rilasciato dal composto **5a** raggiunge un valore massimo in 18 min (il "peakingtempo"), e poi diminuisce, presumibilmente a seguito di processi ossidativi  $\text{O}_2$  mediati. È stato anche misurata la produzione di  $\text{H}_2\text{S}$

ad altri valori di pH, (pH 5,5 e 9,0) e le curve di rilascio osservate risultano abbastanza simili.



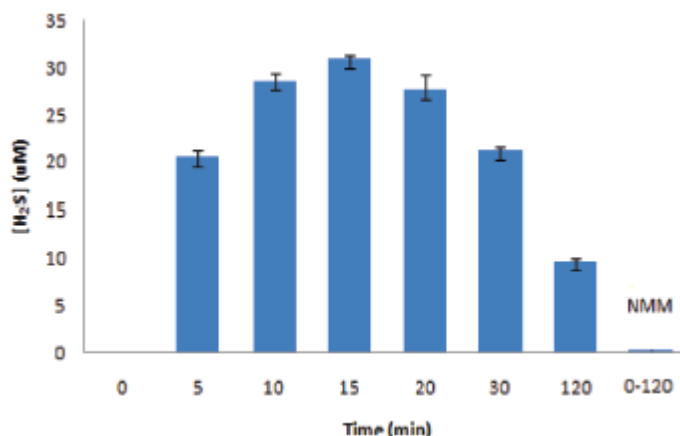
**Figura 14**

I tempi di rilascio e di concentrazione di H<sub>2</sub>S sono parametri utili per valutare il tasso di generazione di H<sub>2</sub>S da parte dei donatori. Pertanto sono stati misurati tali parametri dai corrispondenti composti 5a-l a pH 7,4, ed i risultati sono riassunti nella Tabella 1. In generale, i gruppi elettron-donatori promuovono una lenta generazione di H<sub>2</sub>S mentre i gruppi elettron-attrattori aumentano la velocità di rilascio di H<sub>2</sub>S. Perciò questi risultati hanno dimostrato che attraverso modificazioni strutturali dei donatori si può ottenere un rilascio controllato di H<sub>2</sub>S.

<div style="text-align: center;"> <p><b>5</b> Concentration: (40 <math>\mu</math>M)</p> <p>excess Cysteine PBS Buffer (pH = 7.4) <math>\rightarrow</math> <math>H_2S</math></p> </div>					
donors	peaking time (min)	peaking time [ $H_2S$ ] ( $\mu$ M)	donors	peaking time (min)	peaking time [ $H_2S$ ] ( $\mu$ M)
	18	25.4		22	31.0
	16	35.2		25	20.8
	13	35.6		30	24.2
	14	30.7		25	21.5
	25	26.1		50	23.0
	18	31.4		22	17.5

**Tabella 1: peaking time**

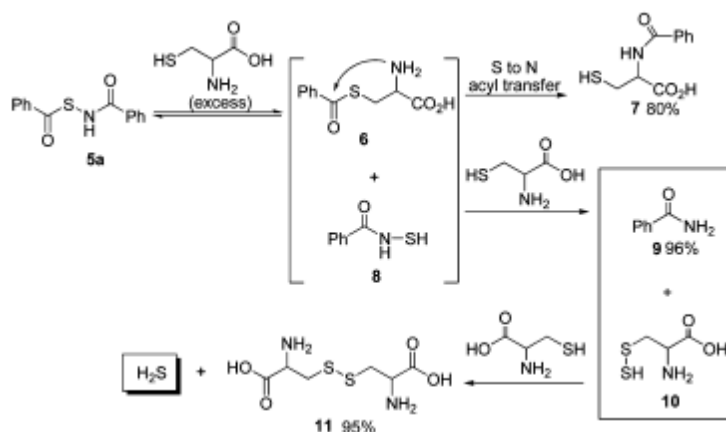
È noto che il plasma può contenere una grande quantità di cisteina libera. È stato quindi misurato la generazione di  $H_2S$  dai composti 5 nel plasma contenente ~500 micron di cisteina utilizzando un metodo colorimetrico. E' stato osservato un rilascio tempo-dipendente di  $H_2S$  simile a quello mostrato nella Figura 14 (la figura 15 mostra i risultati ottenuti utilizzando 5a).



**Figura 15**

Quando il plasma viene trattato con N-metilmaleimide (NMM) per bloccare la cisteina libera, non è stata osservata nessuna generazione di H<sub>2</sub>S. Questi risultati dimostrano la capacità dei composti N- (benzoiltio) benzamidi di essere ottimi donatori di H<sub>2</sub>S nei sistemi biologici complessi e mostrano anche che la cisteina è il regolatore di questi tipi di donatori.

Infine, per comprendere il meccanismo di generazione di H<sub>2</sub>S da N- (benzoiltio) benzamidi, è stata analizzata la reazione tra 5a e cisteina (10 equiv). Come mostrato nello Schema 5, tale reazione porta alla formazione di N-acilcisteina (7), benzammide (9), e cistina (11) in alte rese. La reazione viene iniziata dalla reazione del gruppo tiolico di 5a con quello della cisteina per generare il tioestere (6) e l'N-mercaptobenzamide (8). Il composto 6 poi subisce un veloce trasferimento acilico da S-a-N per formare l'ammide (7). La reazione tra la N-mercaptobenzamide 8 e l'eccesso di cisteina porta all'addotto 9 e cisteina pertiolo (10). Infine la reazione tra il derivato 10 e cisteina porta alla formazione del composto disolfuro 11 e alla liberazione di una molecola di H<sub>2</sub>S.



**Schema 5**

Questi nuovi donatori di  $\text{H}_2\text{S}$  con scheletro N-(benzoiltio)benzammidico hanno dimostrato di essere stabili in tamponi acquosi. La produzione di  $\text{H}_2\text{S}$  da parte di queste molecole è cisteina-dipendente, e può essere modulata con appropriate modifiche strutturali. Possono essere perciò considerati ottimi donatori di  $\text{H}_2\text{S}$ , fornendo anche ai ricercatori nuove possibilità di sviluppare originali ligandi quali donatori di  $\text{H}_2\text{S}$ . Inoltre un ulteriore sviluppo di composti basati su gruppi N-mercapto come donatori di  $\text{H}_2\text{S}$  e la valutazione delle loro attività biologiche sono attualmente in studio [66,67].

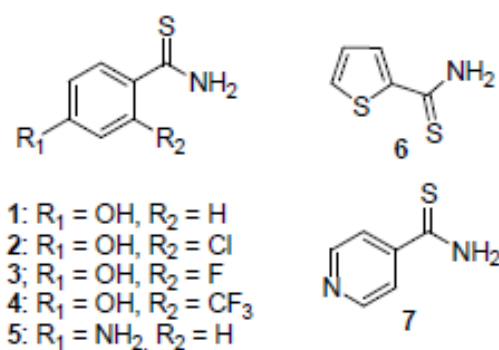
### 3.2 Ariltioammidi

La somministrazione di  $\text{H}_2\text{S}$  gassoso è significativamente limitata dal rischio di un basso controllo posologico e di overdose, sembra quindi essere più sicuro l'uso di appropriati agenti chimici che si comportano come rilascianti  $\text{H}_2\text{S}$ . Così, i composti che esibiscono il profilo farmacologico di agenti rilascianti  $\text{H}_2\text{S}$  possono essere visti sia come potenti strumenti per studi di base sia come agenti farmacoterapeutici per molte patologie cardiovascolari. In questo lavoro, una piccola libreria di ariltioammidi (composti 1-7 figura 16) sono stati preparati e valutati per la loro capacità di rilasciare  $\text{H}_2\text{S}$ . Il para idrossibenziltioamide 1 [59] è stato selezionato come composto lead per costruire la libreria apportando piccole modifiche sull'anello aromatico come ad esempio:

- (i) Introduzione di diversi gruppi elettroattrattori (Cl, F,  $\text{CF}_3$ ) in posizione 2 dell'anello fenilico (composti 2-4)
- (ii) Sostituzione del gruppo idrossilico con un gruppo amminico (composto 5) a

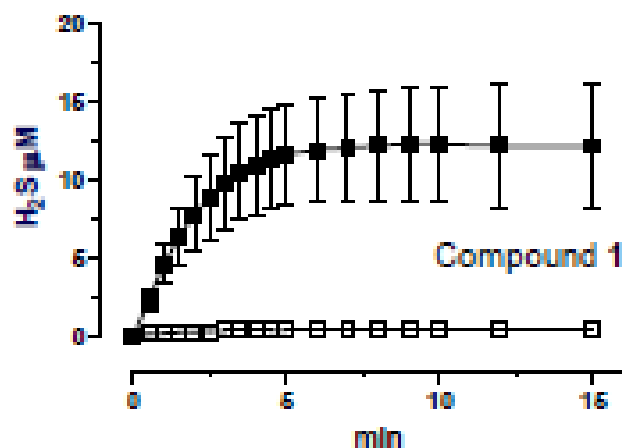
(iii) Sostituzione dell'anello fenilico con eterociclielettron ricchi o elettron poveri come il tiofene (composto 6) o piridina (composto 7) rispettivamente (figura 16).

Tra le varie molecole sintetizzate capaci di rilasciare  $H_2S$ , il composto 1 è stato selezionato e saggiato per valutare le eventuali proprietà vasorilascianti  $H_2S$ -mediate, l'attività iperpolarizzante sulle membrane delle cellule muscolari lisce vascolari umane e gli effetti indotti sulla pressione sanguigna di un ratto normoteso.



**Figura 16.** Strutture di agenti  $H_2S$ -rilascianti conosciute di recentemente sintetizzati.

Inizialmente i composti sintetizzati furono saggiati per valutare la loro capacità di rilasciare  $H_2S$ . La determinazione di  $H_2S$  è stata effettuata mediante un approccio amperometrico sia in presenza che in assenza di cisteina. La Figura 17 riporta la curva  $H_2S$ -rilascio Vs tempo del composto 1, preso come rappresentante della serie delle tioamidi.



**Figure 17.** La curva descrive l'aumento della concentrazione di H<sub>2</sub>S, rispetto al tempo, in assenza (quadrati bianchi) o in presenza (quadrati neri) di L-Cisteina.

Il para idrossibenzotioamide 1 esibisce un rilascio di H<sub>2</sub>S in presenza di L-cisteina. In assenza dell'amminoacido, 1 non ha mostrato significative proprietà H<sub>2</sub>S-rilascianti. (figura 17). Per quanto riguarda i derivati 2 sostituiti 4 idrossibenzotioamidici 2-4, l'incubazione di 2 (2-Cl) e 3 (2-F) conduce ad un rilascio H<sub>2</sub>S dipendente da L-cisteina, in assenza di L-cisteina il rilascio di H<sub>2</sub>S è trascurabile per entrambi i composti. Al contrario, l'inserimento di un sostituito 2-CF<sub>3</sub> o la sostituzione di un gruppo -OH con un gruppo amminico primario (derivati 4 e 5, rispettivamente) provoca la drastica riduzione della capacità di rilasciare H<sub>2</sub>S, in assenza ma anche in presenza di cisteina. Le tioamidi eterocicliche 6 e 7 hanno mostrato invece un profilo interessante. In particolare il derivato 6 ha esibito un debole rilascio di H<sub>2</sub>S (sia in presenza che in assenza di L-cisteina). Anche la piridiltioamide 7 esibisce una modesta ma significativa generazione di H<sub>2</sub>S in assenza di L-cisteina. Invece in presenza dell'amminoacido questo composto ha mostrato un aumento di 6 volte del valore di C<sub>max</sub>.

Sulla base della buona capacità di rilasciare H<sub>2</sub>S, il composto 1 è stato selezionato per ulteriori studi farmacologici con lo scopo di valutare gli effetti farmacologici in modelli in vitro attribuibili al rilascio di H<sub>2</sub>S endogeno. Inizialmente, è stata testata l'attività del composto 1 sulla vasocostrizione indotta da Noradrenalina (NA) su anelli aortici isolati di ratto, ed è stato interessante notare che il pretrattamento degli anelli aortici, inibisce quasi del tutto gli effetti vasocostrittori di NA.



Quindi i sopradescritti risultati sperimentali suggeriscono che:

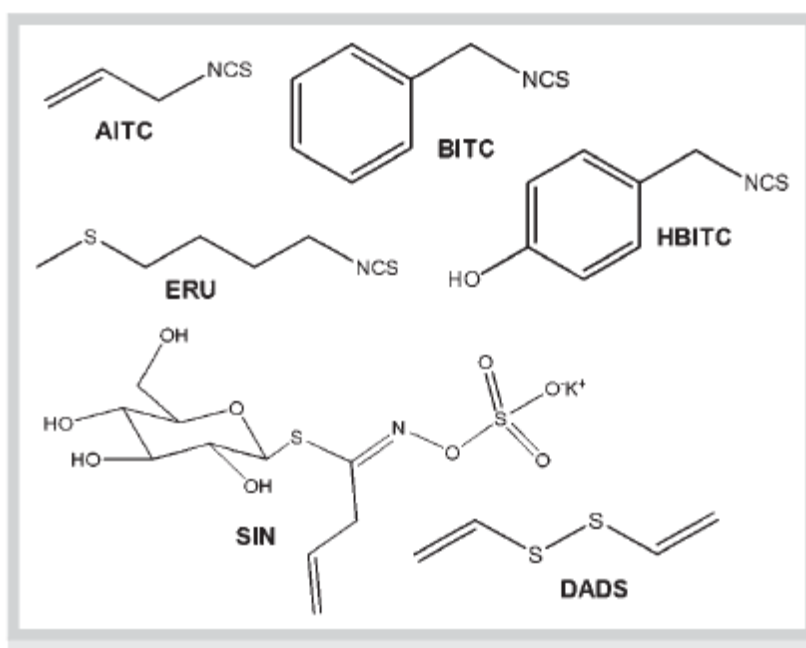
- a) I tioli organici endogeni, possono assicurare il rilascio di  $H_2S$  dal composto 1
- b) una presenza prolungata di  $H_2S$  a basse concentrazioni sembra essere efficiente nell'inibire gli effetti vasocostrittori di NA

In conclusione molte delle ariltioammidi (1-3,7) hanno mostrato un lento meccanismo  $H_2S$  donatore, dipendente da L-cisteina: il gas è stato lentamente rilasciato con un meccanismo che necessita della presenza di tioli organici, come la L-cisteina. Ulteriori studi farmacologici del para-idrossibenzotioamide(1) in modelli in vitro e in vivo hanno confermato che 1 presenta alcune proprietà tipiche dell' $H_2S$  quali l'effetto vasorilasciante. È stata inoltre osservata una significativa riduzione della pressione sistolica nel sangue nei ratti normotesi anestetizzati dopo la somministrazione orale della ariltioammide 1. Nell'insieme questi risultati mostrano che il razionale sviluppo di promettenti agenti  $H_2S$  rilascianti potrebbe offrire nuove opportunità per la scoperta di nuovi trattamenti terapeutici per patologie cardiovascolari [68].

### **3.3 Isotiocianati naturali**

Un recente studio ha dimostrato la capacità di alcuni isotiocianati di rilasciare in maniera lenta  $H_2S$ , mostrando quindi la possibilità di impiego in ambito farmacologico di molecole contenenti il gruppo NCS come potenziali  $H_2S$ -donatori. In natura sono ampiamente conosciute molecole che presentano tale raggruppamento. Tra questi si ritrovano i metaboliti secondari di piante principalmente appartenenti alla famiglia delle Brassicaceae, una grande famiglia botanica che comprende molte specie commestibili come la Brassica oleracea L., Brassica nigra, Sinapis alba L. Ecc [69]. L'utilità fitoterapica e nutraceutica di Brassicaceae nella prevenzione di importanti malattie umane, come il cancro, malattie neurodegenerative, processi e malattie cardiovascolari è stata ampiamente discussa nella letteratura scientifica. Anche se questi effetti sono stati in gran parte attribuiti a isotiocianati, l'esatto meccanismo d'azione è ancora sconosciuto. Un recente lavoro sperimentale, ha evidenziato come alcuni importanti isotiocianati naturali rilasciano  $H_2S$ , con studi effettuati in vitro mediante rilevamento amperometrico. Alcuni degli isotiocianati naturali testati hanno mostrato un significativo rilascio di  $H_2S$  che ci porta ad ipotizzare che  $H_2S$ , possa essere, almeno in

parte, un “mediatore” rilevante per molti effetti biologici attribuiti a principi attivi contenuti nelle Brassicaceae. Tra i più importanti isotiocianati, presenti in molte specie di Brassicaceae, si ritrovano: isotiocianato di allile (AITC, altamente presente nella Senape nera, *B. Nigra*), 4-idrossibenzilisotiocianato (HBITC, altamente presente in senape bianca, *S.alba*), benzilisotiocianato (BITC, altamente presente in *Lepidium Sativum* L.) ed erucina, (ERU presente in diverse specie come broccoli, *B.Oleracea* L. e rucolo *Eruca vesicaria* L.) (figura 18). Altri derivati di origine naturale e riconosciuti come agenti di rilascio di  $H_2S$  sono i polisolfuri organici appartenenti alla famiglia delle Alliaceae. Tra questi il disolfuro di allile (DADS), è il più importante esponente presente nella pianta dell’aglio (figura 18). Attualmente, i glucosinolati insieme ai corrispondenti isotiocianati, stanno ricevendo grande interesse scientifico per i loro numerosi effetti biologici, farmacologici e per le potenziali applicazioni utili in molti aspetti della salute umana.



**Figura 18.** Struttura chimica dei composti testati.

L’attività dei composti selezionati che rilasciano  $H_2S$  è stata studiata mediante un approccio amperometrico affidabile, già utilizzato per studi analoghi. La capacità di rilascio di  $H_2S$  è una caratteristica farmacologicamente rilevante, già attribuita a composti naturali, come i polisolfuri diallilici dell’aglio, ma mai riportata per gli isotiocianati naturali. Infatti, in precedenti studi, l’incubazione dei farmaci di riferimento

DADS hanno portato alla formazione trascurabile di H<sub>2</sub>S in assenza di L-cisteina; ma, in presenza di questo aminoacido, l'incubazione di DADS è stata seguita da una formazione relativamente lenta di H<sub>2</sub>S, con C<sub>max</sub> di circa 20 pM (Tabella 2). Per quanto riguarda gli isotiocianati testati nel presente lavoro, ERU e BITC esibivano proprietà più deboli (seppur significative) di rilascio di H<sub>2</sub>S. In particolare, ERU e BITC si comportavano come donatori molto poveri di H<sub>2</sub>S sia in assenza che in presenza di L-cisteina (Tabella 2; Figura 19 e 20).

Compound	AB C <sub>max</sub> (μM)	AB + L-Cys C <sub>max</sub> (μM)
DADS	< 0.5	18.9 ± 4.8
AITC	0.5 ± 0.2	6.2 ± 1.3
BITC	< 0.5	1.9 ± 0.4
ERU	0.5 ± 0.2	1.9 ± 0.1
HBITC	11.0 ± 0.8	17.9 ± 1.5
SIN	< 0.5	< 0.5

Tabella 2

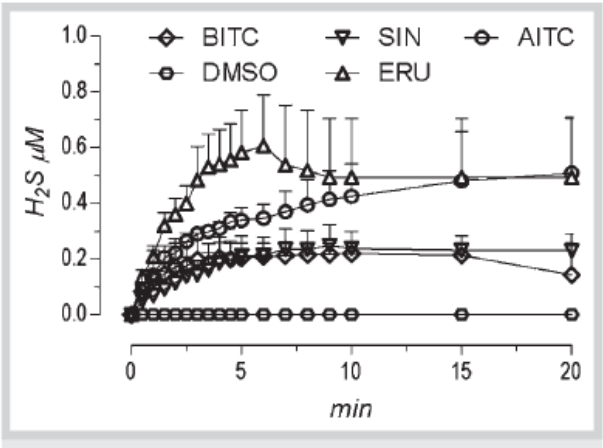


Figura 19

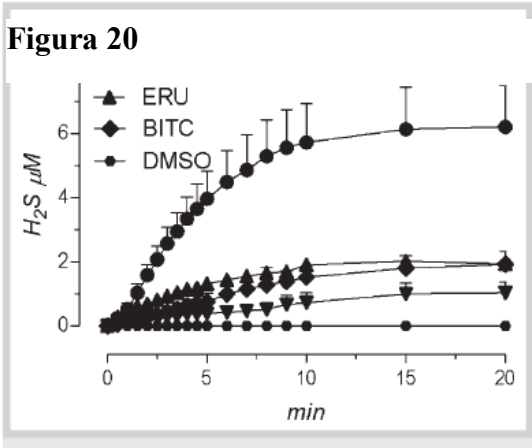
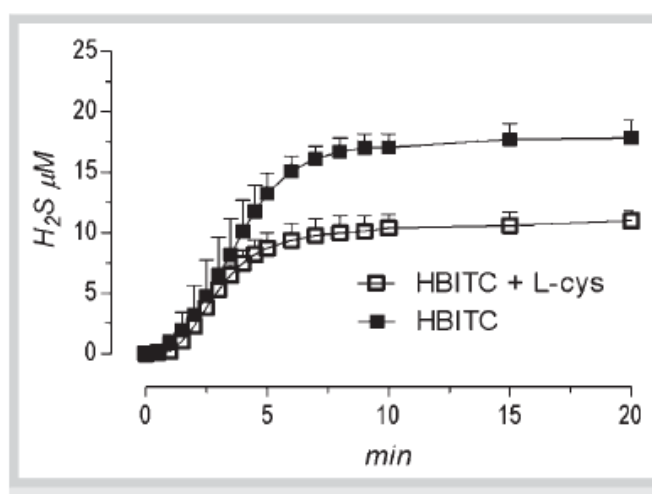


Figura 20

AITC ha portato alla formazione di quantità apprezzabili di H<sub>2</sub>S, ma solo in presenza di L-cisteina. Infatti, in assenza di L-cisteina, l'incubazione di AITC ha portato alla formazione di basse concentrazioni di H<sub>2</sub>S; quindi, la presenza di L-cisteina ha causato un significativo miglioramento delle proprietà di rilascio di H<sub>2</sub>S da AITC (Tabella 2; Figura 19 e 20). Il rilascio L-cisteina-dipendente, è probabilmente dovuto al

comportamento nucleofilo dell'amminoacido, ed è già stato osservato per diversi donatori di  $H_2S$ , come ad esempio GYY4137, DADS, e molti tioammidi sintetici e isotiocianati [70]. Tra i pochi metaboliti secondari selezionati di Brassicaceae, HBITC è stato il più efficace donatore di  $H_2S$ , mostrando un significativo e notevole rilascio di  $H_2S$ . In particolare, in assenza di L-cisteina, l'incubazione di HBITC è stata seguita da una generazione lenta dei livelli apprezzabili di  $H_2S$  (circa 10 micron). La co-presenza dell'amminoacido ha portato ad un notevole aumento del rilascio di  $H_2S$  da HBITC (Tabella 2; Figura 21).

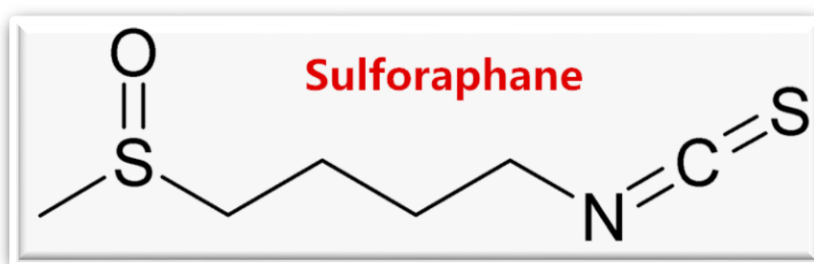


**Figura 21**

Le proprietà di rilascio di  $H_2S$  da HBITC, registrato in presenza di L-cisteina, sono quindi equivalenti a quelli rilasciati da DADS analizzati in studi precedenti, ma, a differenza di DADS, HBITC si comportava donatore di  $H_2S$ , anche in assenza di questo aminoacido. L'utilità nutraceutica e fitoterapica delle Brassicaceae nella prevenzione di importanti malattie umane, come il cancro, processi neurodegenerativi e malattie cardiovascolari, è stata ampiamente discussa in letteratura scientifica. Sebbene questi effetti siano ragionevolmente attribuiti a isotiocianati (principalmente formati dai corrispondenti glucosinolati dall'attività enzimatica della mirosinasi, presente nella pianta, ma anche nella microflora batterica intestinale dei mammiferi) il meccanismo esatto d'azione è ancora sconosciuto.

### 3.3.1 Sulforafano

Il sulforafano (Isotiocianato-4-(metilsulfinil) butano) (SF) è una molecola presente in varie specie di Brassica, soprattutto nei broccoli che contengono glucorafanina. A seguito del taglio o della masticazione, essa viene idrolizzata nel corrispondente isotiocianato SF sia dall'azione della mirosinasitioglucosidasi sia dall'azione della tioglucosidasi batterica presente nel colon [71]. Il SF ha mostrato di avere effetti neuroprotettivi in numerosi modelli sperimentali.



**Figura 22. Struttura chimica del Sulforafano.**

Oltre a questa attività, sono state descritte per il SF altre numerose proprietà biologiche attribuibili alla sua capacità di interagire con diversi target biologici. La sua elevata lipofilia e le dimensioni molecolari, consentono a SF di passare per diffusione all'interno degli enterociti. A seguito dell'assorbimento enterico subisce una coniugazione con il glutathione (GSH-SF) ad opera della glutathione-S-transferasi (GST), che permette di mantenere un gradiente di concentrazione e facilita un veloce assorbimento passivo all'interno delle cellule. Esso viene metabolizzato attraverso la via acida mercapturica, che produce prevalentemente cisteinilglicina (SFCG), cisteina (SF-Cys), e N-acetilcisteina (SF-NAC), coniugati che vengono escreti nelle urine [72]. Studi farmacocinetici condotti sia sull'uomo che sugli animali, hanno dimostrato che la concentrazione plasmatica di SF e dei suoi metaboliti aumenta rapidamente, raggiungendo un massimo compreso tra 1 e 3 h dopo la somministrazione di SF, di glucosinolati, o di broccoli. In particolare alcuni studiosi hanno dimostrato la capacità di SF e dei suoi metaboliti di raggiungere differenti tessuti nel tratto gastrointestinale e genitourinario e di altri organi come fegato, pancreas, polmone e cuore, in ampie e differenti concentrazioni, perché la bioattività in termini di induzione dell'enzima citoprotettivo di fase II potrebbe differire

significativamente tra gli organi. I livelli di questi metaboliti sia nel plasma che nei tessuti si riducono in circa 12-24h a causa della loro eliminazione attraverso l'escrezione urinaria [73]. In vivo la bioattività di ciascun metabolita SF è ancora incerta, anche se alcuni studi in vitro suggeriscono che i metaboliti SF-cis, e SF-NAC siano in grado di esercitare una certa attività biologica [74]. Per esercitare effetti protettivi nei confronti dei disturbi neurodegenerativi e migliorare la funzione cerebrale, SF, deve attraversare la barriera emato-encefalica (BEE) o accumularsi nel sistema nervoso centrale (SNC). Diversi studi in modelli animali di neurodegenerazione indicano che la SF raggiunge il SNC e promuove effetti protettivi a questo livello.

### 3.3.1 Sulforafano contro lo stress ossidativo

SF ha dimostrato di aumentare l'espressione di molti enzimi antiossidanti ARE-dipendenti in diversi sistemi cellulari, come ad esempio GR, GPx, glutaredossina (GLRX), tioredossina (TX), TR, HO1, e NQO1. A seguito della formazione di ponti disolfuro tra SF e Keap1 il complesso keap-Nrf2 si dissocia favorendo quindi la traslocazione di Nrf2 nel nucleo. Nrf2 è un classico attivatore delle proteine antiossidanti ARE che una volta sintetizzate inducono l'attivazione della risposta antiossidante e detossificante.

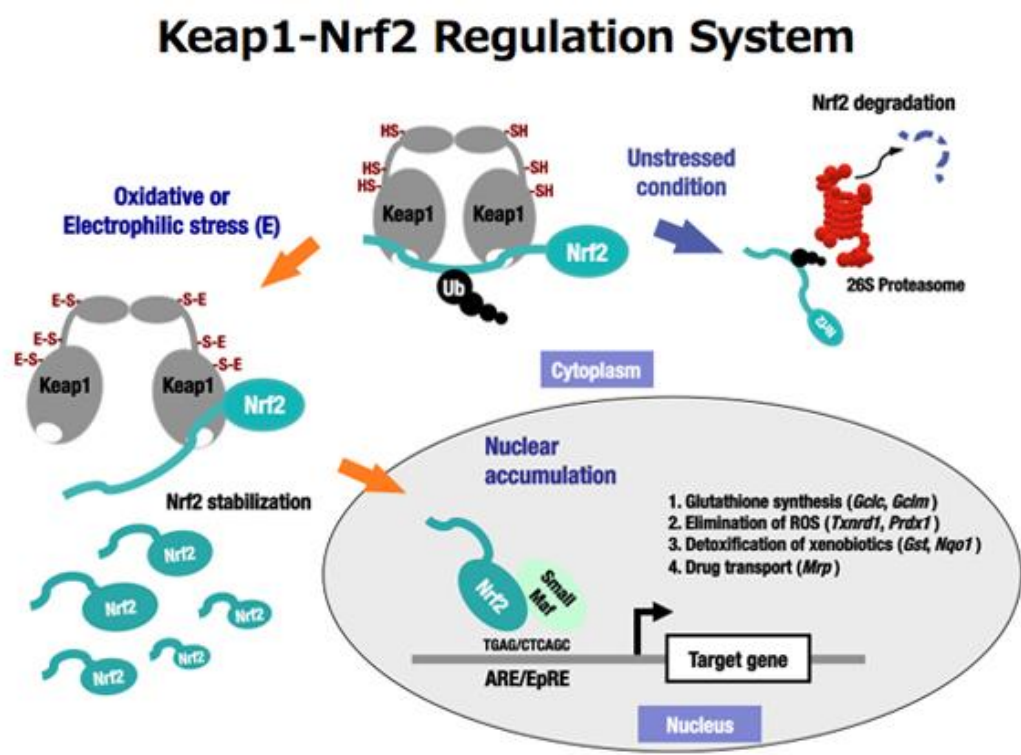


Figura 23. Sistema di regolazione Keap1-Nrf2.

### **3.3.2 Sulforafano contro la neurodegenerazione acuta**

In un modello di danno cerebrale da ischemia/ipossia nel neonato, Ping et al. [75] hanno osservato che SF aumenta significativamente l'espressione di Nrf2 e HO-1 che era accompagnata da un volume ridotto dell'infarto. In particolare, il trattamento con SF riduce il numero di neuroni apoptotici, attiva le macroglia, ed alcuni parametri ossidativi, come la quantità di 8-idrossi-2-deossiguanosina e i livelli di MDA. Zhao et al. [76] hanno dimostrato che la somministrazione prolungata di una singola dose di SF riduce significativamente nei topi il volume dell'infarto cerebrale conseguente all'ischemia locale. Inoltre, negli astrociti corticali del topo, il trattamento con SF prima o dopo la privazione di ossigeno e glucosio riduce marcatamente la morte cellulare, stimolando il percorso di Nrf2 per l'espressione del gene antiossidante. Queste evidenze indicano che SF può contrastare l'ischemia/riperfusionne grazie alla sua abilità di modulare Nrf2 e il segnale intracellulare per le reazioni redox.

### **3.3.3 Il sulforafano e il danno cerebrale da trauma**

Il danno cerebrale da trauma (TBI) è definito come un danneggiamento del cervello causato da una forza meccanica esterna. I sopravvissuti ad un TBI restano con disabilità a lungo termine, e perfino un lieve TBI può lasciare i soggetti con difficoltà cognitive, difficoltà di concentrazione, mal di testa, ed affaticamento. TBI è un complesso processo patologico caratterizzato da una prima fase in cui si verifica un danno meccanico al tessuto cerebrale e a cui segue una seconda fase in cui risulta attivata una serie di eventi cellulari e molecolari responsabili del danno ossidativo e della morte delle cellule cerebrali [77]. Studi recenti in un modello di TBI nel ratto hanno mostrato che la somministrazione di SF dopo la lesione riduce il danno della barriera ematoencefalica e l'edema cerebrale dopo TBI [78]. Gli autori suggeriscono che l'effetto osservato di neuroprotezione da parte di SF potrebbe essere dovuto ad una combinazione di meccanismi che comprendono una ridotta permeabilità della barriera ematoencefalica, una sopravvivenza cellulare potenziata, e/o aumentati livelli dei canali AQP4 che hanno la funzione di rimuovere il liquido in eccesso e mantenere l'omeostasi del fluido cerebrale.

## CAPITOLO 4

### Applicazioni terapeutiche

#### **4.1 Gli effetti protettivi del sulforafano contro la neurodegenerazione cronica**

##### **4.1.1 Morbo di Alzheimer**

In questo contesto Park et al. [79] hanno dimostrato gli effetti neuroprotettivi di SF contro lo stress ossidativo, confermando l'abilità di SF di potenziare l'attività del proteosoma e di proteggere le cellule neuronali dalla citotossicità mediata dal peptide A $\beta$ 1-42. Studi più recenti hanno riportato che SF induce l'espressione della proteina 27 per lo shock termico, dimostrando che l'attività del proteosoma stimolata da SF possa contribuire alla citoprotezione [80]. Questi dati suggeriscono che l'induzione del proteosoma da parte di SF possa facilitare l'eliminazione dei peptidi A $\beta$ 1-42 e porti al miglioramento dell'alterata configurazione delle proteine nel morbo di Alzheimer. Kim et al. [81] hanno approfondito i potenziali effetti neuroprotettivi di SF in un modello murino di morbo di Alzheimer acuto, indotto dal peptide A $\beta$ 1-40. In particolare, essi hanno registrato l'abilità di SF di migliorare l'alterazione delle funzioni cognitive sebbene esso non interagisca direttamente con A $\beta$ . Queste scoperte rinforzano gli effetti neuroprotettivi indiretti di SF contro la tossicità da A $\beta$ .

##### **4.1.2 Morbo di Parkinson**

Usando un modello di *Drosophila* con  $\alpha$ -sinucleinopatia, Trinh et al. [82] hanno osservato che la morte neuronale che accompagna l'espressione di  $\alpha$ -sinucleina, elemento chiave nella patogenesi di questo disordine, -non si conosce ancora l'esatta funzione biologica dell' $\alpha$ -sinucleina ma è stato osservato che un eccesso della proteina  $\alpha$ -sinucleina possa causare perdita dei neuroni dopaminergici-, è potenziata da mutazioni che inducono la perdita di funzionalità nei geni coinvolti nel processo di detossificazione di fase II, specificatamente, nel metabolismo del glutatione. Questa perdita neuronale può essere superata con induttori farmacologici, come SF, che aumentano la sintesi di glutatione o il processo di coniugazione col glutatione. Gli autori hanno anche osservato

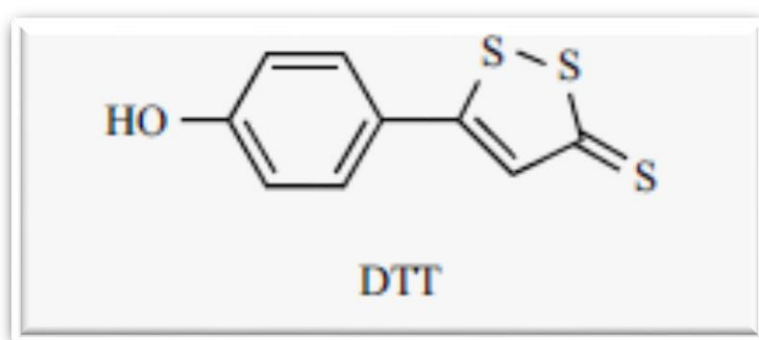


simili effetti neuroprotettivi di SF in ceppi di *Drosophila* con una mutazione nella proteina parkina, in un altro modello di perdita di funzionalità del morbo di Parkinson. Diversi studi in vitro hanno mostrato che SF era in grado di ridurre significativamente i livelli di chinone dopaminergico nelle linee cellulari dopaminergiche, come CATH.a e SK-N-BE(2)C, oltre che nei neuroni dopaminergici del mesencefalo, attivati dalla 6-idrossidopamina (6-OHDA) e da BH4 [83]. In particolare, Han et al. [84] hanno evidenziato che SF può proteggere le cellule dopaminergiche dalla citotossicità della 6-OHDA e da BH4 attraverso l'eliminazione del chinone dopaminergico intracellulare, perché l'attività dell'enzima NQO1 e i livelli di mRNA sono incrementati dal trattamento con SF ed il numero delle proteine modificate per la presenza del chinone risulta diminuito. In aggiunta, il chinone dopaminergico può produrre specie neurotossiche in seguito alla sua reazione con i tioli cellulari per formare la 5-S-cisteinildopamina (CysDA). Gli addotti di CysDA sono stati individuati nel tessuto cerebrale umano e sono numerosi nei pazienti che soffrono del morbo di Parkinson. Deng et al. [85] hanno osservato che SF inibiva la citotossicità indotta dalla 6-OHDA nelle cellule SH-SY5Y attraverso l'aumento della traslocazione nucleare di Nrf2 e dell'espressione di OH-1 in una modalità dipendente da PI3K/Akt. Inoltre, altri autori hanno confermato che l'attivazione di Nrf2 da parte di SF possa giocare un ruolo importante nella protezione dei neuroni dopaminergici contro la tossicità indotta da 6-OHDA nelle colture organo tipiche nigrostriatali del ratto [86]. Per quanto riguarda i modelli di neurodegenerazione in vivo, Jazwa et al. [87] hanno dimostrato che SF induceva una risposta di fase II Nrf2-dipendente nei gangli basali e proteggeva contro la morte delle cellule nigrali dopaminergiche, contro l'astrogliosi e la microgliosi nel modello murino di morbo di Parkinson con 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina.

## **4.2 H<sub>2</sub>S e FANS nel trattamento di patologie infiammatorie**

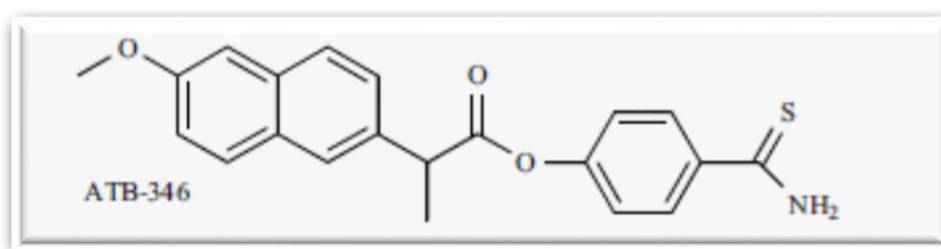
I farmaci antinfiammatori non steroidei, sono stati i primi esempi di donatori di H<sub>2</sub>S. Nel decennio passato, sono state fondate diverse compagnie che si sono concentrate nello sfruttare il potente effetto antinfiammatorio e citoprotettivo di H<sub>2</sub>S, sviluppando dei derivati di alcuni farmaci che rilasciano H<sub>2</sub>S, con maggiore attenzione sui FANS. I bersagli principali di questi farmaci sono il dolore e l'infiammazione, e con il rilascio di H<sub>2</sub>S si ha un vantaggio principale che consiste nella riduzione dell'ulcera gastrointestinale, normalmente causata dai FANS. Questi nuovi donatori sono stati

quindi sviluppati e sintetizzati modificando la loro struttura con ADT-OH [5-(4-idrossifenil)-3H-1,2-ditio-3-tione]. La combinazione di FANS consolidati con derivati di ADT-OH ha messo chiaramente in evidenza il potenziale farmacologico di H<sub>2</sub>S, e questi nuovi composti si sono dimostrati una notevole promessa per alleviare e limitare gli effetti collaterali gastrointestinali e la tossicità dei FANS, e per il trattamento di patologie infiammatorie intestinali, di edema, di shock endotossico e dell'infiammazione acuta. [88].



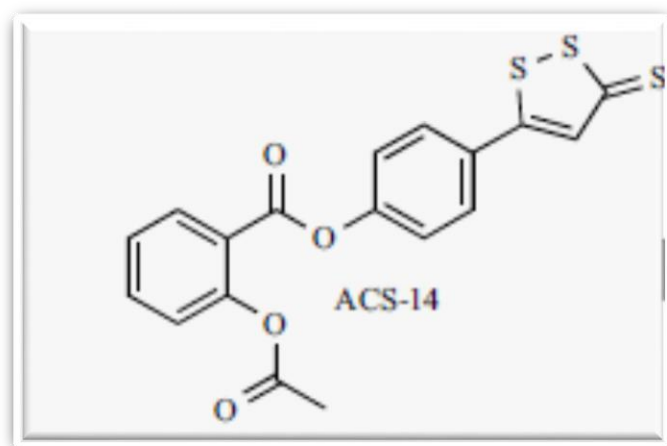
**Figura 24. Struttura chimica del DTT.**

Tra questi nuovi donatori il composto guida è ATB-346; un derivato del naprossene. In studi animali di patologie quali l'artrite indotta artificialmente, il farmaco ha prodotto effetti antiinfiammatori paragonabili a quelli ottenuti con dosi equimolari del farmaco originario, ma, a differenza del farmaco di partenza, ATB-346 ha prodotto un danno trascurabile nel tratto gastrointestinale, perfino a dosi molto elevate e in animali con un'integrità della mucosa ridotta [89].



**Figura 35. Struttura chimica di ATB-346.**

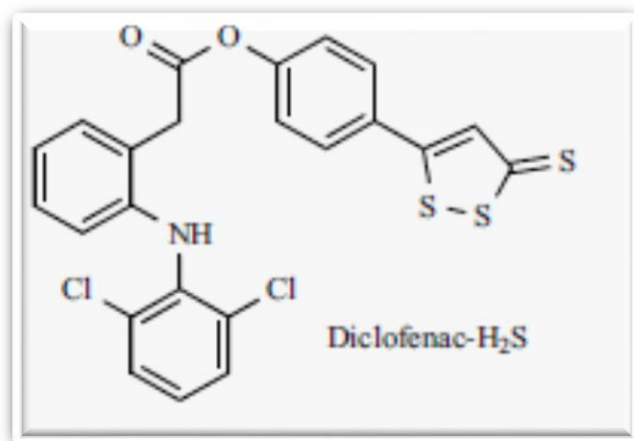
Un altro donatore, ottenuto modificando la propria struttura con ADT-OH è l'ACS-14, un derivato dell'aspirina, la cui somministrazione per endovena nei ratti ha causato un aumento marcato e transitorio di  $H_2S$  nel plasma, riducendo in modo significativo i livelli plasmatici di cicloossigenasi, e bloccando quindi la produzione di trombossani e prostaglandine. Questo effetto è quasi equivalente a quello prodotto da dosi equimolari di aspirina, ma in più ACS-14 ha abbassato le concentrazioni plasmatiche di 8-isoprostano, considerato un indicatore di stress ossidativo. I livelli ematici di 8-isoprostano sono diminuiti grazie a DTT, e non sono stati influenzati dall'aspirina, perciò questo effetto è dovuto solo ai donatori di  $H_2S$ . Inoltre dopo la somministrazione orale di ACS-14 nel ratto, i livelli plasmatici di GSH e la sua concentrazione tissutale nel cuore e nell'aorta sono migliorati, mentre l'aspirina non ha influenzato questi parametri [90]. E' noto che la somministrazione orale cronica di acido acetilsalicilico in ratti produce generalmente una significativa lesione emorragica, ma questo effetto negativo è stato impedito grazie alla somministrazione di dosi orali equimolari di ACS-14, evidenziando che questo derivato dell'aspirina donatore di  $H_2S$  è dotato di un migliore profilo di sicurezza gastrica [90].



**Figura 26. Struttura chimica di ACS-14.**

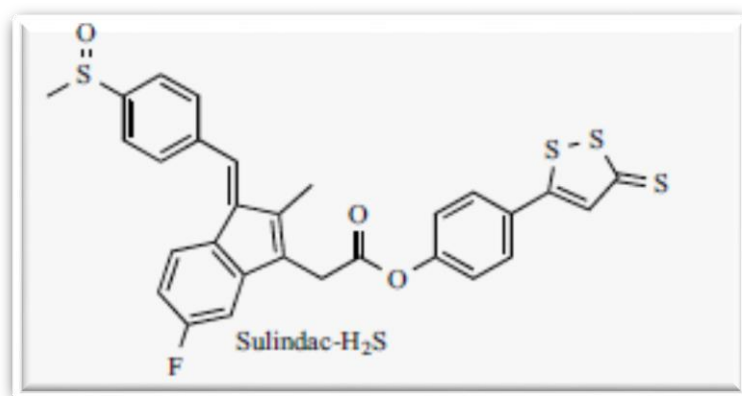
Altro esempio è un derivato del diclofenac donatore di  $H_2S$  [91], questo derivato ibrido ha mostrato un miglioramento dell'effetto antinfiammatorio, e ancora ha ridotto le lesioni gastriche e non ha influenzato i parametri dell'ematocrito; mentre dosi equimolari

di diclofenac producono significative lesioni gastriche e riducono i valori dell'ematocrito, a causa dell'ulcerazione e del sanguinamento della mucosa gastrica [91].



**Figura 27. Struttura chimica del Diclofenac-H<sub>2</sub>S.**

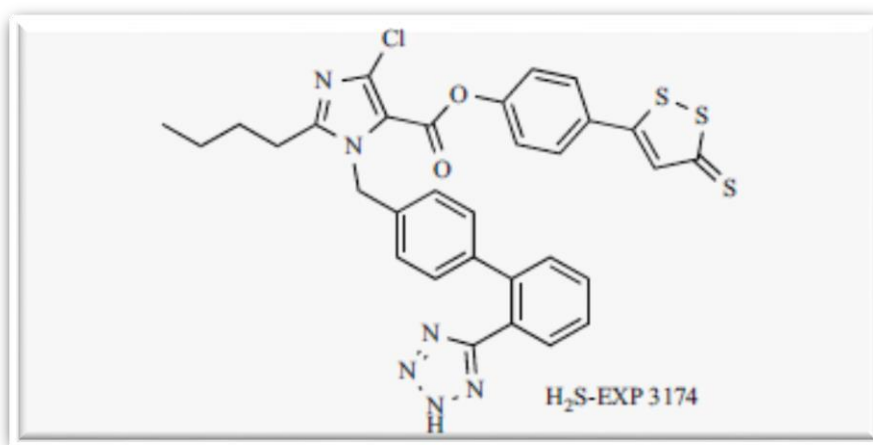
Degno di nota, è anche il Sulindac, ottenuto per coniugazione del farmaco originario con DTT. Questo farmaco espone interessanti effetti antiangiogenici, grazie alla fosforilazione delle heat shock protein-27. Il farmaco originario non mostra questi effetti, quindi la porzione di ditioltione è un requisito fondamentale per l'effetto anti-angiogenico, legata a complessi meccanismi, quali l'attivazione di canali KATP, l'attivazione di protein-chinasi intracellulari, e la regolazione delle metalloproteinasi [92].



**Figura 28. Struttura chimica del Sulindac- H<sub>2</sub>S.**

### 4.3 H<sub>2</sub>S e Sartani nel trattamento dell'ipertensione

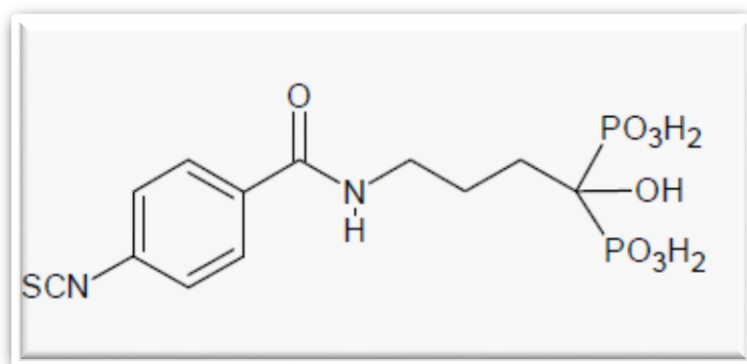
I Sartani sono farmaci impiegati in terapia per il trattamento dell'ipertensione. Essi sono antagonisti dei recettori per l'angiotensina II di tipo AT<sub>1</sub>, e agiscono quindi a livello del sistema renina-angiotensina. Questo potente meccanismo farmacodinamico impedisce tutti gli effetti pro-ipertensivi della angiotensina II, che sono principalmente mediate da ATR<sub>1</sub>. Tuttavia, i sartani non presentano effetti rilassanti diretti sulla muscolare liscia vascolare, o effetti antiaggreganti piastrinici e anti-ischemici o ancora proprietà cardioprotettive. Tali attività farmacologiche sono viste come caratteristiche complementari utili per rafforzare gli effetti antiipertensivi e / o ridurre alcuni fattori di rischio pericolosi spesso associati all'ipertensione. Queste considerazioni hanno portato quindi, allo sviluppo dei primi donatori di NO, derivati dal losartan (e dal suo metabolita attivo EXP3174), che esibiscono un duplice profilo: sono infatti antagonisti di ATR<sub>1</sub> e lenti donatori di NO [93]. Più avanti però, si è pensato di progettare anche per questa classe di farmaci, sartani donatori di H<sub>2</sub>S, mediante coniugazione con DTT, in quanto come già è stato osservato per gli NO-sartani, anche nel caso degli H<sub>2</sub>S-sartani, gli effetti antiipertensivi dovuti all'antagonismo dei recettori ATR<sub>1</sub>, possono essere migliorati ulteriormente con le proprietà cardiovascolari mediate da H<sub>2</sub>S, come l'effetto diretto di vasodilatazione, l'attività antiaggregante piastrinica e l'effetto cardioprotettivo [94].



**Figura 29. Struttura chimica di H<sub>2</sub>S-EXP 3174 (metabolita attivo del losartan).**

#### 4.4 H<sub>2</sub>S e Alendronato nel trattamento dell'osteoporosi

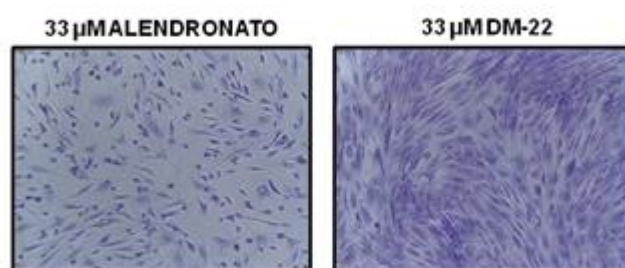
Dati preliminari generati presso i laboratori dell'Istituto Rizzoli suggeriscono una rilevante capacità da parte di H<sub>2</sub>S di modulare la funzione e il differenziamento fenotipico delle cellule ossee umane. Esperimenti preliminari hanno suggerito che H<sub>2</sub>S eserciti una funzione di stimolo sulle cellule mesenchimali staminali (MSC), i precursori degli osteoblasti, inducendo un aumento della deposizione di nuova matrice minerale ossea. Sulla base di queste premesse, è stata sintetizzata una molecola originale, denominata DM-22 e costituita da un farmaco idrido che unisce le proprietà di un noto farmaco per l'osteoporosi, l'Alendronato (farmaco che negli ultimi anni ha evidenziato alcuni effetti collaterali negativi, riconducibili essenzialmente ad un eccesso di soppressione della funzionalità cellulare tanto degli OC quanto degli osteoblasti), con quelle di un gruppo funzionale in grado di rilasciare H<sub>2</sub>S. La molecola DM-22, nasce con l'intento di accoppiare una funzione anti-catabolica dell'Alendronato (espressa dai gruppi pirofosfato) con una anabolica espressa da H<sub>2</sub>S.



**Figura 31. Struttura chimica di DM-22.**

L'azione biologica di DM-22 è stata pertanto testata su osteoblasti e osteoclasti umani nell'intento primario di misurarne l'effetto sulla capacità di differenziamento e sulla funzione fisiologica. I risultati ottenuti indicano che la molecola DM-22, mostra un profilo di maggiore sicurezza rispetto all'Alendronato dal momento che non solo non induce alcuna tossicità o perdita di vitalità cellulare, ma in alcune condizioni ha mostrato effetti cito-protettivi. La molecola DM-22, ha infatti dimostrato anch'essa una forte capacità di inibire il differenziamento degli OC, ma solamente nella concentrazione più

elevata ( $33\mu\text{M}$ ), senza causarne la totale inibizione tipica dell'Alendronato, mantenendo quindi intatta la funzione omeostatica degli OC. Perciò in considerazione del fatto che Alendronato ha un'emivita molto lunga e che esso mostra una spiccata tendenza ad accumularsi nella matrice minerale ossea, i dati su DM-22 suggeriscono, nel loro complesso, che questa molecola possa avere un effetto assai più bilanciato rispetto ad Alendronato sulle cellule ossee, visto che da un lato, DM-22 rimane comunque capace di bloccare la funzione degli OC, ma richiede una maggiore concentrazione perciò potrebbe esercitare una soppressione moderata e non radicale della funzione stessa degli OC, e dall'altro, DM-22 riesce ad indurre, nello stesso range di concentrazioni entro cui inibisce gli OC, una significativa funzione di stimolo della mineralizzazione da parte delle MSC umane [95].



**Figura 31. Vitalità cellulare di cellule MSC dopo stimolo con Alendronato o DM-22.**

## Conclusioni

La velocità con cui il settore chimico farmaceutico e farmacologico sta sviluppando nuove terapie basate sul mediatore gassoso  $H_2S$  riflette i promettenti risultati ottenuti con la valutazione delle sue proprietà farmacologiche sia in studi preclinici che clinici. La scoperta del mediatore  $H_2S$ , e il suo ruolo sostanziale in vari sistemi fisiologici e patologici, ha portato allo sviluppo di molecole capaci di rilasciare  $H_2S$  a velocità controllata. Tra le varie classi di composti dotati di tali proprietà e discussi nella presente tesi si ritrovano in natura gli isotiocianati e il sulforafano (presenti nelle Brassicacee). Più recentemente sono stati sviluppati nuovi composti, sinteticamente più accessibili e dotati delle stesse proprietà di donare in vivo  $H_2S$ ; tra questi si trovano S-Nitrosotiooli e ariltioammidi.

La maggiorparte dei farmaci ottenuti dalla combinazione di farmaci nativi con porzioni molecolari capaci di rilasciare  $H_2S$ , presentano proprietà antiinfiammatorie, vasorilascianti e antiipertensive che risultano essere migliori rispetto al farmaco nativo in termini o di efficacia o di ridotta tossicità.

L'utilizzo di ibridi di farmaci noti, con molecole donatrici di questo gas, si è mostrato particolarmente interessante nel trattamento di alcune patologie legate all'infiammazione, all'osteoporosi e all'ipertensione.

Dal punto di vista chimico farmaceutico, la possibilità di conferire proprietà donatori di  $H_2S$  a molecole native è stato l'unico approccio ad oggi perseguito. Questa strategia potrebbe rappresentare un limite all'impiego di tali molecole per trattamenti di alcune patologie, come ad esempio le patologie neurodegenerative, in cui è necessario che il farmaco possa raggiungere il target biologico (SNC) e solo in un secondo momento possa liberare  $H_2S$  dalla porzione molecolare combinata al farmaco nativo.

E' quindi auspicabile, in un prossimo futuro, lo sviluppo di nuove molecole:

- (a) capaci di "veicolare" l' $H_2S$  nell'organo bersaglio, per esempio utilizzando il trasporto attivo di proteine trasportatrici specifiche oppure
  - (b) nuove molecole che promuovono la formazione di  $H_2S$  "in situ" a seguito di una regolazione allosterica di enzimi deputati alla sua biosintesi come il CBS, CSE e MST.
- Questi aspetti indicano che benchè la ricerca in ambito farmacologico sull' $H_2S$  abbia prodotto notevoli risultati, in ambito chimico-farmaceutico le strategie adottate per lo sviluppo di molecole capaci di modulare  $H_2S$  rappresentano l'esordio di nuovi e



potenziali approcci sintetici per lo sviluppo nuovi “tools” farmacologici. Le molecole così ottenute potranno permettere in futuro sia lo studio approfondito di tale mediatore da un punto di vista biochimico e farmacologico ma anche lo sviluppo di nuovi trattamenti farmacologici per patologie sia cardiovascolari che neurodegenerative.

# Bibliografia

- 1 Levitt, M. D., Abdel-Rehim, M. S. & Furne, J. Free and acid-labile hydrogen sulfide concentrations in mouse tissues: anomalously high free hydrogen sulfide in aortic tissue. *Antioxid. Redox Signal.* **15**, 373–378 (2011).
- 2 Shibuya, N. *et al.* 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase produces hydrogen sulfide and bound sulfane sulfur in the brain. *Antioxid. Redox Signal.* **11**, 703–714 (2009).
- 3 Szabo, C. *et al.* Tumor-derived hydrogen sulfide, produced by cystathionine- $\beta$  synthase, stimulates bioenergetics, cell proliferation, and angiogenesis in colon cancer. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **110**, 12474–12479 (2013).
- 4 Szabo, C. Hydrogen sulfide and its therapeutic potential. *Nature Rev. Drug Discov.* **6**, 917–935 (2007).
- 5 Tang, G., Wu, L., Liang, W. & Wang, R. Direct stimulation of KATP channels by exogenous and endogenous hydrogen sulfide in vascular smooth muscle cells. *Mol. Pharmacol.* **68**, 1757–1764 (2005).
- 6 Yang, G., Cao, K. & Wang, R. Cystathionine  $\gamma$ -lyase overexpression inhibits cell proliferation via a H<sub>2</sub>S-dependent modulation of ERK1/2 phosphorylation and p21Cip/ WAK 1. *J. Biol. Chem.* **279**, 49199–49205 (2004).
- 7 Zhang, R. *et al.* Hydrogen sulfide inhibits L-type calcium currents depending upon the protein sulfhydryl state in rat cardiomyocytes. *PLoS ONE* **7**, e37073 (2012).
- 8 Elies, J. *et al.* Hydrogen sulfide inhibits Cav3.2 T-type Ca<sup>2+</sup> channels. *FASEB J.* **28**, 5376–5387 (2014).
- 9 Avanzato, D. *et al.* Role of calcium channels in the protective effect of hydrogen sulfide in rat cardiomyoblasts. *Cell. Physiol. Biochem.* **33**, 1205–1214 (2014).
- 10 Mustafa, A. K. *et al.* Hydrogen sulfide as endothelium-derived hyperpolarizing factor sulfhydrates potassium channels. *Circ. Res.* **109**, 1259–1268 (2011). **This study provides chemical and functional evidence for the role of H<sub>2</sub>S as an EDHF.**
- 11 Li, Q. *et al.* A crucial role for hydrogen sulfide in oxygen sensing via modulating large conductance calcium-activated potassium channels. *Antioxid. Redox Signal.* **12**, 1179–1189 (2010).
- 12 Sitdikova, G. F., Weiger, T. M. & Hermann, A. Hydrogen sulfide increases Ca<sub>v</sub>-activated K<sub>v</sub> (BK) channel activity of rat pituitary tumor cells. *Pflugers. Arch.* **459**, 389–397 (2010).
- 13 Lu, M. *et al.* Hydrogen sulfide inhibits plasma renin activity. *J. Am. Soc. Nephrol.* **21**, 993–1002 (2010).
- 14 Bauer, C. C., Boyle, J. P., Porter, K. E. & Peers, C. Modulation of Ca<sub>v</sub> signalling in human vascular endothelial cells by hydrogen sulfide. *Atherosclerosis* **209**, 374–380 (2010).

- 15 Liang, G. H., Xi, Q., Leffler, C. W. & Jaggar, J. H. Hydrogen sulfide activates Ca<sup>2+</sup> sparks to induce cerebral arteriole dilatation. *J. Physiol.* **590**, 2709–2720 (2012).
- 16 Kelleher, Z. T., Matsumoto, A., Stamler, J. S. & Marshall, H. E. NOS2 regulation of NF-κB by S-nitrosylation of p65. *J. Biol. Chem.* **282**, 30667–30672 (2007).
- 17 Han, Y. F. *et al.* Evidence that endogenous hydrogen sulfide exerts an excitatory effect on gastric motility in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **673**, 85–95 (2011).
- 18 Kabil, O. & Banerjee, R. Characterization of patient mutations in human persulfide dioxigenase (ETHE1) involved in H<sub>2</sub>S catabolism. *J. Biol. Chem.* **287**, 44561–44567 (2012).
- 19 Yan, S. K. *et al.* Effects of hydrogen sulfide on homocysteine-induced oxidative stress in vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **351**, 485–491 (2006).
- 20 Liu, Y. Y. & Bian, J. S. Hydrogen sulfide protects amyloid β-induced cell toxicity in microglia. *J. Alzheimers Dis.* **22**, 1189–1200 (2010).
- 21 Vacek, T. P., Gillespie, W., Tyagi, N., Vacek, J. C. & Tyagi, S. C. Hydrogen sulfide protects against vascular remodeling from endothelial damage. *Amino Acids* **39**, 1161–1169 (2010).
- 22 Xu, Z. S. *et al.* Hydrogen sulfide protects MC3T3 E1 osteoblastic cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage-implications for the treatment of osteoporosis. *Free Radic. Biol. Med.* **50**, 314–323 (2011).
- 23 Yang, G. *et al.* H<sub>2</sub>S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine γ-lyase. *Science* **322**, 587–590 (2008).  
This study provides direct evidence for the physiological importance of endogenous H<sub>2</sub>S (mice deficient in CSE displayed significant elevations of blood pressure).
- 24 Trionnaire, S. *et al.* The synthesis and functional evaluation of a mitochondria-targeted hydrogen sulfide donor, (10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5-yl)phenoxy)decyl)triphenylphosphonium bromide (AP39). *Med. Chem. Commun.* **5**, 728–736 (2014).
- 25 Fu, M. *et al.* Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) metabolism in mitochondria and its regulatory role in energy production. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **109**, 2943–2948 (2012).
- 26 Papapetropoulos, A. *et al.* Hydrogen sulfide is an endogenous stimulator of angiogenesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **106**, 21972–21977 (2009).
- 27 Madden, J. A., Ahlf, S. B., Dantuma, M. W., Olson, K. R. & Roerig, D. L. Precursors and inhibitors of hydrogen sulfide synthesis affect acute hypoxic pulmonary vasoconstriction in the intact lung. *J. Appl. Physiol.* **112**, 411–418 (2012).
- 28 Zhao, W., Ndisang, J. F. & Wang, R. Modulation of endogenous production of H<sub>2</sub>S in rat tissues. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **81**, 848–853 (2003).
- 29 Coletta, C. *et al.* Hydrogen sulfide and nitric oxide are mutually dependent in the regulation of angiogenesis and endothelium-dependent vasorelaxation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **109**, 9161–9166 (2012).
- 30 Paquette, J. M. *et al.* Safety, tolerability and pharmacokinetics of trimebutine 3-thiobarbamoylbenzenesulfonate (GIC-1001) in a randomized Phase I integrated design

- study: single and multiple ascending doses and effect of food in healthy volunteers. *Clin. Ther.* **36**, 1650–1664 (2014).
- 31 Fitzgerald, R. *et al.* H<sub>2</sub>S relaxes isolated human airway smooth muscle cells via the sarcolemmal KATP channel. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **446**, 393–398 (2014).
  - 32 Wang, Y. *et al.* Role of hydrogen sulfide in the development of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29**, 173–179 (2009).
  - 33 Mani, S. *et al.* Decreased endogenous production of hydrogen sulfide accelerates atherosclerosis. *Circulation* **127**, 2523–2534 (2013).
  - 34 Liu, Z. *et al.* The hydrogen sulfide donor, GYY4137, exhibits anti-atherosclerotic activity in high fat fed apolipoprotein E<sup>-</sup> mice. *Br. J. Pharmacol.* **169**, 1795–1809 (2013).
  - 35 Mani, S., Yang, G. & Wang, R. A critical life-supporting role for cystathionine  $\gamma$ -lyase in the absence of dietary cysteine supply. *Free Radic. Biol. Med.* **50**, 1280–1287 (2011).
  - 36 Zhang, H. *et al.* Hydrogen sulfide inhibits the development of atherosclerosis with suppressing CX3CR1 and CX3CL1 expression. *PLoS ONE* **7**, e41147 (2012).
  - 37 Jain, S. K., Micinski, D., Lieblong, B. J. & Stapleton, T. Relationship between hydrogen sulfide levels and HDL-cholesterol, adiponectin, and potassium levels in the blood of healthy subjects. *Atherosclerosis* **225**, 242–245 (2012).
  - 38 Fiorucci, S. *et al.* The third gas: H<sub>2</sub>S regulates perfusion pressure in both the isolated and perfused normal rat liver and in cirrhosis. *Hepatology* **42**, 539–548 (2005).
  - 39 Tan, G. *et al.* Hydrogen sulfide attenuates carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity, liver cirrhosis and portal hypertension in rats. *PLoS ONE* **6**, e25943 (2011).
  - 40 Morsy, M. A., Ibrahim, S. A., Abdelwahab, S. A., Zedan, M. Z. & Elbitar, H. I. Curative effects of hydrogen sulfide against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Life Sci.* **87**, 692–698 (2010).
  - 41 Li, L. *et al.* Hydrogen sulfide is a novel mediator of lipopolysaccharide-induced inflammation in the mouse. *FASEB J.* **19**, 1196–1198 (2005).
  - 42 Norris, E. J. *et al.* Hydrogen sulfide modulates sinusoidal constriction and contributes to hepatic microcirculatory dysfunction during endotoxemia. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **304**, G1070–G1078 (2013).
  - 43 Lipson, K. L., Fonseca, S. G. & Urano, F. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and auto-immunity in diabetes. *Curr. Mol. Med.* **6**, 71–77 (2006).
  - 44 Yusuf, M. *et al.* Streptozotocin-induced diabetes in the rat is associated with enhanced tissue hydrogen sulfide biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **333**, 1146–1152 (2005).
  - 45 Yang, G., Tang, G., Zhang, L., Wu, L. & Wang, R. The pathogenic role of cystathionine  $\gamma$ -lyase/hydrogen sulfide in streptozotocin-induced diabetes in mice. *Am. J. Pathol.* **179**, 869–879 (2011).
  - 46 Liu, F. *et al.* Hydrogen sulfide improves wound healing via restoration of endothelial progenitor cell functions and activation of angiopoietin 1 in type 2 diabetes. *Diabetes* **63**, 1763–1778 (2014).

- 47 Zhong, X. *et al.* Exogenous hydrogen sulfide attenuates diabetic myocardial injury through cardiac mitochondrial protection. *Mol. Cell. Biochem.* **371**, 187–198 (2012).
- 48 Tang, X. Q. *et al.* Effect of hydrogen sulfide on  $\beta$ -amyloid-induced damage in PC12 cells. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **35**, 180–186 (2008).
- 49 Zhang, L. M., Jiang, C. X. & Liu, D. W. Hydrogen sulfide attenuates neuronal injury induced by vascular dementia via inhibiting apoptosis in rats. *Neurochem. Res.* **34**, 1984–1992 (2009).
- 50 Kida, K. *et al.* Inhaled hydrogen sulfide prevents neurodegeneration and movement disorder in a mouse model of Parkinson's disease. *Antioxid. Redox Signal.* **15**, 343–352 (2011).
- 51 Campolo, M. *et al.* A hydrogen sulfide-releasing cyclooxygenase inhibitor markedly accelerates recovery from experimental spinal cord injury. *FASEB J.* **27**, 4489–4499 (2013).
- 52 Donatti, A. F. *et al.* Role of hydrogen sulfide in the formalin-induced orofacial pain in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **738**, 49–56 (2014).
- 53 Wallace, J. L. *et al.* Anti-inflammatory and cytoprotective actions of hydrogen sulfide: translation to therapeutics. *Antiox. Redox Signal.* **22**, 398–410 (2015).
- 54 Distrutti, E. *et al.* Evidence that hydrogen sulfide exerts antinociceptive effects in the gastrointestinal tract by activating KATP channels. *J. Pharm. Exp. Therap.* **316**, 325–335 (2006).
- 55 Fiorucci, S. *et al.* Inhibition of hydrogen sulfide generation contributes to gastric injury caused by anti-inflammatory nonsteroidal drugs. *Gastroenterology* **129**, 1210–1224 (2005).
- 56 Wallace, J. L., Caliendo, G., Santagada, V. & Cirino, G. Markedly reduced toxicity of a hydrogen sulphide-releasing derivative of naproxen (ATB-346). *Br. J. Pharmacol.* **159**, 1236–1246 (2010).
- 57 Zayachkivska, O. *et al.* Cytoprotective effects of hydrogen sulfide in novel rat models of non-erosive esophagitis. *PLoS ONE* **9**, e110688 (2014).
- 58 Blackler, R. *et al.* Gastrointestinal sparing effects of novel NSAIDs in rats with compromised mucosal defence. *PLoS ONE* **7**, e35196 (2012).
- 59 Flannigan, K. L., Ferraz, J. G. P., Wang, R. & Wallace, J. L. Enhanced synthesis and diminished degradation of hydrogen sulfide in experimental colitis: a site-specific, pro-resolution mechanism. *PLoS ONE* **8**, e71962 (2013).
- 60 Wallace, J. L., Vong, L., McKnight, W., Dicay, M. & Martin, G. R. Endogenous and exogenous hydrogen sulfide promotes resolution of colitis in rats. *Gastroenterology* **137**, 569–578 (2009).
- 61 Flannigan, K. L. *et al.* Impaired hydrogen sulfide synthesis and IL-10 signaling underlie hyperhomocysteinemia-associated exacerbation of colitis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **111**, 13559–13564 (2014).
- 62 Billaut-Laden, I. *et al.* Evidence for a functional genetic polymorphism of the human mercaptopyruvate sulfurtransferase (MPST), a cyanide detoxification enzyme. *Toxicol. Lett.* **165**, 101–111 (2006).
- 63 Fu, M. *et al.* Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) metabolism in mitochondria and its regulatory role in energy production. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **109**, 2943–2948 (2012).

- 64 Yang, W., Yang, G., Jia, X., Wu, L. & Wang, R. Activation of KATP channels by H<sub>2</sub>S in rat insulin-secreting cells and the underlying mechanisms. *J. Physiol.* **569**, 519–531 (2005).
- 65 Martelli, Alma; Testai, Lara et al. **Arylthioamides as H<sub>2</sub>S-donors: L-Cysteine-activated releasing properties and vascular effects in vitro and in vivo**, *ACS Medicinal Chemistry Letters* 21-Dec-2012.
- 66 Valentina Citi, Alma Martelli, Lara Testai et al. *Hydrogen Sulfide Releasing Capacity of Natural Isothiocyanates: Is It a Reliable Explanation for the Multiple Biological Effects of Brassicaceae?* **2014**; 80: 610–613.
- 67 Dinkova-Kostova AT, Kostov RV. Glucosinolates and isothiocyanates in health and disease. *Trends Mol Med* 2012; 18: 337–347.
- 68 Martelli A, Testai L, Citi V, Marino A, Pugliesi I, Barresi E, Nesi G, Rapposelli S, Taliani S, Da Settimo F, Breschi MC, Calderone V. Arylthioamides as H<sub>2</sub>S donors: L-cysteine-activated releasing properties and vascular effects in vitro and in vivo. *ACS Med Chem Lett* 2013; 4: 904–908.
- 69 K. Kassahun, M. Davis, P. Hu, B. Martin, and T. Baillie, “Biotransformation of the naturally occurring isothiocyanatesulforaphane in the rat: identification of phase I metabolites and glutathione conjugates,” *Chemical Research in Toxicology*, vol.10, no. 11, pp. 1228–1233, 1997.
- 70 O. L. Veeranki, A. Bhattacharya, J. R. Marshall, and Y. Zhang, “Organ-specific exposure and response to sulforaphane, a key chemopreventive ingredient in broccoli: implications for cancer prevention,” *British Journal of Nutrition*, vol. 109, no. 1, pp. 25–32, 2013.
- 71 M. C. Myzak, P. A. Karplus, F.-L. Chung, and R. H. Dashwood, “A novel mechanism of chemoprotection by sulforaphane: inhibition of histone deacetylase,” *Cancer Research*, vol. 64, no. 16, pp. 5767–5774, 2004.
- 72 J. D. Clarke, A. Hsu, K. Riedl et al., “Bioavailability and interconversion of sulforaphane and erucin in human subjects consuming broccoli sprouts or broccoli supplement in a crossover study design,” *Pharmacological Research*, vol. 64, no. 5, pp. 456–463, 2011.
- 73 A. Jazwa, A. I. Rojo, N. G. Innamorato, M. Hesse, J. Fern´andez- Ruiz, and A. Cuadrado, “Pharmacological targeting of the transcription factor Nrf2 at the basal ganglia provides disease modifying therapy for experimental parkinsonism,” *Antioxidants and Redox Signaling*, vol. 14, no. 12, pp. 2347–2360, 2011.
- 74 J.D.Clarke, A.Hsu,D. E.Williams et al., “Metabolism and tissue distribution of sulforaphane in Nrf2 knockout and wild-type mice,” *Pharmaceutical Research*, vol. 28, no. 12, pp. 3171–3179, 2011.
- 75 J. Zhao, A. N. Moore, G. L. Clifton, and P. K. Dash, “Sulforaphane enhances aquaporin-4 expression and decreases cerebral edema following traumatic brain injury,” *Journal of Neuroscience Research*, vol. 82, no. 4, pp. 499–506, 2005.
- 76 J. Zhao, A. N. Moore, J. B. Redell, and P. K. Dash, “Enhancing expression of Nrf2-driven genes protects the blood-brain barrier after brain injury,” *Journal of Neuroscience*, vol. 27, no. 38, pp. 10240–10248, 2007.

- 77 Y. Hong, W. Yan, S. Chen et al., "The role of Nrf2 signaling in the regulation of antioxidants and detoxifying enzymes after traumatic brain injury in rats and mice," *Acta Pharmacologica Sinica*, vol. 31, no. 11, pp. 1421–1430, 2010.
- 78 P.K.Dash, J. Zhao, S.A.Orsi,M. Zhang, andA.N.Moore, "Sulforaphane improves cognitive function administered following traumatic brain injury," *Neuroscience Letters*, vol. 460, no. 2, pp.103–107, 2009.
- 79 K. Trinh, K. Moore, P. D. Wes et al., "Induction of the phase II detoxification pathway suppresses neuron loss in Drosophila models of Parkinson's disease," *Journal of Neuroscience*, vol. 28,no. 2, pp. 465–472, 2008.
- 80 N. S. Yoon, Y. Cho, S. Y. Lee, H. J. Choi, and O. Hwang, "Inactivation of aconitase by tetrahydrobiopterin in DArgic cells: relevance to PD," *Experimental Neurobiology*, vol. 19, no. 1, pp. 23–29, 2010.
- 81 J. M. Han, Y. J. Lee, S. Y. Lee et al., "Protective effect of sulforaphane against dopaminergic cell death," *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 321, no. 1,pp. 249–256, 2007.
- 82 Andrea Tarozzi, Cristina Angeloni,MarcoMalaguti et al. *Sulforaphane as a Potential Protective Phytochemical against Neurodegenerative Diseases* Volume 2013, Article ID 415078, 10 pages.
- 83 A.Tarozzi, F. Morroni, A. Merlicco et al., "Sulforaphane as an inducer of glutathione prevents oxidative stress-induced cell death in a dopaminergic-like neuroblastoma cell line," *Journal of Neurochemistry*, vol. 111, no. 5, pp. 1161–1171, 2009.
- 84 A.Tarozzi, F. Morroni, C. Bolondi et al., "Neuroprotective effects of erucin against 6-hydroxydopamine-induced oxidative damage in a dopaminergic-like neuroblastoma cell line," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 13, no. 9, pp. 10899–10910, 2012.
- 85 C. Deng, R. Tao, S. Z. Yu, and H. Jin, "Sulforaphane protects against 6-hydroxydopamine-induced cytotoxicity by increasing expression of heme oxygenase-1 in a PI3K/Akt-dependent manner," *Molecular Medicine Reports*, vol. 5, no. 3, pp. 847–851,2012.
- 86 A. Siebert, V. Desai, K. Chandrasekaran, G. Fiskum, and M. S. Jafri, "Nrf2 activators provide neuroprotection against 6-hydroxydopamine toxicity in rat organotypic nigrostriatal cocultures," *Journal of Neuroscience Research*, vol. 87, no. 7, pp. 1659–1669, 2009.
- 87 A. Jazwa, A. I. Rojo, N. G. Innamorato, M. Hesse, J. Fern'andez- Ruiz, and A. Cuadrado, "Pharmacological targeting of the transcription factor Nrf2 at the basal ganglia provides disease modifying therapy for experimental parkinsonism," *Antioxidants and Redox Signaling*, vol. 14, no. 12, pp. 2347–2360, 2011.
- 88 Whiteman, M. and Winyard, P. G. (2011) Hydrogen sulfide and inflammation: the good, the bad, the ugly and the promising. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* **4**, 13–32
- 89 Wallace, J. L., Caliendo, G., Santagada, V. &Cirino, G. Markedly reduced toxicity of a hydrogen sulphide-releasing derivative of naproxen (ATB-346). *Br. J. Pharmacol.* **159**, 1236–1246 (2010).
- 90 Sparatore, A.; Perrino, E.; Tazzari, V.; Giustarini, D.; Rossi, R.; Rossoni, G.; Erdman, K.; Schroder, H.; Del Soldato, P. Pharmacological profile of a novel H(2)S-releasingaspirin. *Free Rad. Biol. Med.*, **2009**, *47*, 1781

- 91** Wallace, J.L.; Caliendo, G.; Santagada, V.; Cirino, G.; Fiorucci, S. Gastrointestinal safety and anti-inflammatory effects of a hydrogen sulphidereleasing diclofenac derivative in the rat. *Gastroenterology*, **2007**, *132*, 261-271
- 92** Isenberg, J.S.; Jia, Y.; Field, L.; Ridnour, L.A.; Sparatore, A.; Del Soldato, P.; Sowers, A.L.; Yeh, G.C.; Moody, T.W.; Wink, D.A.; Ramchandran, R.; Roberts, D.D. Modulation of angiogenesis by dithiolethione-modified NSAIDs and valproic acid. *Br. J. Pharmacol.*, **2007**, *151*, 63-72
- 93** Breschi, M.C.; Calderone, V.; Digiacomo, M.; Martelli, A.; Martinotti, E.; Minutolo, F.; Rapposelli, S.; Balsamo, A. NO-sartans: a new class of pharmacodynamichybridsascardiovascular drugs. *J. Med. Chem.*, **2004**, *47*, 5597-5600
- 94** Sparatore, A.; Santus, G.; Del Soldato, P. Cardiovascular Agents. *International Patent Application*, **2008**, WO2008/122356
- 95** Lisignoli, G.; Grassi, F.; Calderone, V.; Rapposelli, S. Preparation of isocyanato-substituted  $\alpha$ -hydroxyalkane- $\alpha,\alpha$ -bisphosphonic acid for bone tissue regeneration. WO2016071863A1, 2016.